

Laura Lehtiniemi & Roosa Virtanen

MYKOPLASMAN TUNNISTAMINEN SOLUVILJELYISTÄ PCR-MENETELMÄLLÄ

MYKOPLASMAN TUNNISTAMINEN SOLUVILJEYISTÄ PCR-MENETELMÄLLÄ

Laura Lehtiniemi & Roosa Virtanen
Opinnäytetyö
Syksy 2015
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tekijät: Laura Lehtiniemi ja Roosa Virtanen

Opinnäytetyön nimi: Mykoplasman tunnistaminen soluviljelyistä PCR-menetelmällä

Työn ohjaaja: Paula Reponen ja Outi Mäkitalo

Työn valmistumislukukausi- ja vuosi: Syksy 2015

Sivumäärä: 43+5

Soluviljely on menetelmä, jonka avulla elävien solujen toimintaa voidaan tutkia kontrolloiduissa laboratorio-olosuhteissa. Soluviljelytekniikkaa sovelletaan koko ajan kasvavissa määrin sekä akateemisissa tutkimustarkoituksissa, että teollisuuden parissa esimerkiksi lääke- ja rokotetutannossa. Jotta soluviljelyn avulla saataisiin luotettavia tutkimustuloksia, tulee käytettyjen solulinjojen olla ehdottoman puhtaita. Yksi soluviljelytekniikan merkittävimmistä haittapuolista onkin sen alttius kontaminaatioille, erityisesti mykoplasmaalle.

Mykoplasma on pieni, soluseinätön bakteeri, joka kontaminoi helposti soluviljelyitä. Pienen kokonsa tähden se läpäisee helposti suodattimet ja soluseinättömyytensä ansiosta siihen eivät tehoa kaikki antibiootit. Jokaisella soluviljelylaboratoriolla tulisi olla hyvä menetelmä solulinjojensa testaamiseen mykoplasmojen varalta. Yleisimpiä soluviljelyitä kontaminoivia mykoplasma-lajeja ovat *M. arginini*, *M. pirum*, *M. orale*, *M. hominis*, *M. fermentans*, *M. salivarium* ja *Acholeplasma laidlawii*. Polymeraasiketjureaktio eli PCR on nopea ja herkkä menetelmä mykoplasman tunnistamiseksi soluviljelyistä.

Tämä opinnäytetyöprojekti käynnistyi syksyllä 2014 ValiRX Finland Oy:n eli ValiFinn:n tilaamana. Työn tarkoituksena oli testata PCR-menetelmää ValiFinn:n syöpäsolulinjojen mykoplasma-kontaminaatioiden havaitsemisessa sekä kokeilla kahden eri valmistajan PCR-kitin toimivuutta työn suorituksessa. Käyttämämme PCR-kitit olivat Promokinen Mycoplasma Detection Kit I/C sekä Sigma-Aldrichin LookOut® Mycoplasma PCR Detection kit. Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa ValiFinn:lle luotettavaa teoreettista ja käytännöllistä tietoa PCR-menetelmän käytöstä solulinjojen mykoplasma-testauksessa osana soluviljelylaboratorion laaduntarkkailua sekä sen soveltuvuudesta heidän omien solulinjojensa testaamiseen.

PCR-menetelmä osoittautui nopeaksi ja helposti toteutettavaksi menetelmäksi soluviljelyiden mykoplasma-kontaminaatioiden havaitsemiseksi. Ongelmia ilmeni kuitenkin solujen kasvatusmediumista valmistettujen näytteiden inhiboitumisen kanssa. Inhiboivia tekijöitä pyrittiin eliminoimaan erilaisia näytteentekomenetelmiä kokeilemalla. PCR-reaktio onnistui parhaiten näytteentekomenetelmillä, jossa mykoplasmaa konsentroitiin ja jossa solujen eristetyistä DNA:sta tehtiin 1:100 laimennos. Kaupallisista PCR-kiteistä Sigma-Aldrichin LookOut® PCR Mycoplasma Detection Kit osoittautui paremmaksi, sillä sen kontrollit toimivat jokaisessa testauksessa, kun taas Promokinen Mycoplasma Detection Kit I/C:ssä kontrollit toimivat vain harvoin. Toimivalla PCR-kitillä ja oikealla näytteentekomenetelmällä PCR on todella kätevä menetelmä ValiFinn:n solujen testaamiseen.

Asiasanat: Soluviljely, mykoplasma, kontaminaatio, polymeraasiketjureaktio

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Biomedical Laboratory Science

Authors: Laura Lehtiniemi and Roosa Virtanen

Title of thesis: Detection of Mycoplasma in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction

Supervisors: Paula Reponen and Outi Mäkitalo

Term and year when the thesis was submitted: Autumn 2015 Number of pages: 43+5

Cell culture is a method for studying the living cells in controlled laboratory conditions. During the last few decades it has become an essential tool for researchers. Cell culture technology is applied in academic research and for industrial purposes. In order to get reliable results, it's important that all the cells that are used are extremely pure and free from contaminations. One of the main disadvantage concerning cell culture is the susceptibility for contaminations, such as mycoplasma.

Mycoplasma is a small microorganism from the genus *mollicutes*. Several mycoplasma species such as *M.arginini*, *M.hominis* and *M. orale* are common cell culture contaminants. Every cell culture laboratory should have a suitable method for testing the cell lines for mycoplasma contamination. Polymerase chain reaction (PCR) is a rapid and sensitive method for mycoplasma testing.

The project was commissioned by ValiRX Finlad Oy. The main purpose of this project was to test PCR method for observing mycoplasma contaminations in cell cultures. Two commercial PCR based mycoplasma detection kits were used in this project: Mycoplasma Detection Kit I/C by Promokine and LookOut® Mycoplasma PCR Detection Kit by Sigma-Aldrich. The aim was to produce reliable information about PCR method in detection of mycoplasma contaminations in cell cultures to ValiRX Finland Oy.

Polymerase chain reaction proved to be a fast and easily executed method for detection of mycoplasma in cell cultures. One problem with using the PCR method turned out to be the inhibition of the reaction by cell culture media. Four different PCR sample preparation methods were tested to remove the possible inhibitors from the samples. The best sample preparation method for eliminating the PCR inhibitors seemed to be the method which increases the mycoplasma concentration by centrifugation and a DNA extraction method followed by hundred fold dilution of the sample. The Sigma-Aldrich's LookOut® PCR Mycoplasma Detection kit turned out to be a better kit for PCR testing due to control inhibition problems with Promokine's Mycoplasma Detection Kit I/C.

Keywords: Cell culture, mycoplasma, contamination, polymerase chain reaction

SISÄLLYS

JOHDANTO	6
1 TIETOPERUSTA	8
1.1 Soluviljely	8
1.1.1 Aseptiikka soluviljelyssä	9
1.1.2 Soluviljelylaboratorion laaduntarkkailu	10
1.2 Mykoplasma	11
1.2.1 Mykoplasmat soluviljelyssä	11
1.2.2 Mykoplasmojen tunnistaminen soluviljelyistä	12
1.2.3 Mykoplasmakontaminaatioiden torjunta	13
1.3 PCR-menetelmä mykoplasmojen tunnistamisessa soluviljelyistä	13
2 PROJEKTIN LÄHTÖKOHDAT	16
2.1 Projektin tarkoitus ja tavoitteet	16
2.2 Projektioorganisaatio	17
2.3 Projektissa käytetyt PCR-kitit ja solulinjat	18
3 TYÖVAIHEET	20
3.1 Alkuvalmistelut	20
3.2 Soluviljelyt	21
3.3 Näytteiden valmistus	21
3.4 Polymeerasiketjureaktio (PCR)	23
3.5 Agaroosigeelielektroforeesi	24
3.6 Jätteiden käsittely	25
4 TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET	26
4.1 PCR-testausten tulokset ja kittien käyttökokemukset	26
4.2 Tulosten yhteenveto	34
4.3 Johtopäätökset	35
5 POHDINTA	38
LÄHTEET	41
LIITTEET	44

JOHDANTO

Soluviljely on menetelmä, jonka avulla elävien solujen toimintaa voidaan tutkia kontrolloiduissa laboratorio-olosuhteissa. Viime vuosikymmenien aikana siitä on tullut tärkeä työkalu eri tieteenalojen tutkimuksille. Soluviljelytekniikkaa sovelletaan koko ajan kasvavissa määrin sekä akateemisissa tutkimustarkoituksissa että teollisuuden parissa esimerkiksi lääke- ja rokotetuotannossa. Jotta soluviljelyn avulla saataisiin luotettavia tutkimustuloksia, tulee käytettyjen solulinjojen olla ehdottoman puhtaita. Yksi soluviljelytekniikan merkittävimmistä haittapuolista onkin sen alttius kontaminaatioille, erityisesti mykoplasmaalle. Mykoplasmakontaminaatiot ovatkin olleet tutkijoiden huolenaiheena jo soluviljelytekniikan alkua ajoista lähtien. Kontaminaatiot voivat päätyä viljelmään esimerkiksi laboratorion työntekijöistä, huoneilmasta tai epästeriileistä työvälineistä. (Freshney, 2005, 1-5, 73; Upphoff, Denkmann & Drexler, 2012, 1.)

Mykoplasma on pieni soluseinätön, mollikuuttien luokkaan kuuluva bakteeri, joka voi kontaminoida soluviljelmän helposti ja huomaamattomasti. (Razin 1997, 124). Mykoplasmaalla kontaminoituneen soluviljelmän tunnistaminen on hankalaa, sillä mykoplasma ei ole havaittavissa tavallisella mikroskoopilla eikä se aiheuta kasvatusmediumin pH:n muutosta, kuten useat muut bakteerit (Drexler & Upphoff 2002, 74). Mykoplasman läsnäolo soluviljelmässä vaikuttaa kuitenkin useisiin solun aineenvaihduntaprosesseihin ja voi siten johtaa virheellisiin tutkimustuloksiin (DesRochers, Kuo, Kimmerling, Ehrlich & Kaplan 2015, 1-2). Tästä syystä solulinjojen säännöllinen tarkastaminen piilevien mykoplasmakontaminaatioiden varalta on ensiarvoisen tärkeää.

PCR eli polymeerasiketjureaktio on herkkä ja nopea menetelmä mykoplasmakontaminaatioiden havaitsemiseksi soluviljelyistä. Menetelmässä monistetaan mykoplasman ribosomaalista DNA:ta polymeerasientsyymien avulla. Menetelmän heikkoutena on kuitenkin mahdollinen reaktion estyminen soluviljelyissä yleisesti esiintyvien PCR-reaktioita inhiboivien yhdisteiden vaikutuksesta. (Freshney 2005, 315.)

Tämä opinnäytetyöprojekti toteutettiin yhteistyössä ValiRX Finland Oy:n kanssa. Projektin tarkoituksena oli testata PCR-menetelmän soveltuvuutta yrityksen soluviljelylaboratorion laaduntarkkailutyöhön. Projektissa testattiin kahden eri valmistajan kaupallista PCR-reaktioon perustuvaa mykoplasman tunnistus-kittiä: Promokinen Mycoplasma Detection Kit I/C:tä ja Sigma-Aldrichin LookOut® Mycoplasma Detection Kit:ä. Lisäksi projektissa selvitettiin, millaisella tavalla soluviljely-

medium tulisi valmistaa PCR-näytteeksi, jotta siinä ei esiintyisi PCR-reaktiota inhiboivia yhdisteitä.

1 TIETOPERUSTA

1.1 Soluviljely

Soluviljelyn tarkoituksena on saada solut elämään ja kasvamaan keinotekoisesti *in vitro* – olosuhteissa, kuten esimerkiksi maljalla tai pullossa, samoin kuin ne kasvaisivat organismeissa itsessään, *in vivo* (Clarke & Dillon 2011, 1). Soluviljelyn avulla solujen toimintaa voidaan tutkia kontrolloidusti halutuissa ja hallituissa olosuhteissa (Freshney 2005, 1). Soluja kasvatetaan mediumissa, joka koostumukseltaan vastaa mahdollisimman paljon normaalia solunulkoista nestettä ja tarjoaa solun tarvitsemia ravintoaineita. Monet solutyypit vaativat mediumin lisäksi seerumia (esim. FBS=fetal bovine serum, vasikan seerumi) kasvuunsa. Seerumista solut saavat albumiinia ja tärkeitä kasvutekijöitä. Myös kasvuympäristön eli inkubaattorin lämpötilan ja kaasukoostumuksen tulee pysyä optimaalisena ja stabiilina. Hyvissä olosuhteissa solut täyttävät melko nopeasti käytettävissä olevan kasvutilan, kunnes kasvun tiheysinhibitio tai solun jakautumisen rajallisuus lopulta pysäyttävät kasvun. (Niemi, Virtanen & Vuorio. 1993, 43–44.)

Primääriviljelmällä tarkoitetaan suoraan kudoksesta petrimaljalle kasvatusmediumiin eristettyjä soluja. Tällaiset solut vastaavat parhaiten *in vivo* -olosuhteissa olevia soluja. Ne elävät, jakautuvat rajallisen määrän ja lopulta kuolevat. Kun primääriviljelmän solut jaetaan ensimmäisen kerran uusille kasvualustoille, syntyy solulinja, jonka soluja voidaan jakaa uudelleen useita kertoja. Useat syöpäsolulinjat ovat luonnostaan ”kuolemattomia” eli ne voivat jakautua rajattomasti. Myös normaaleja soluja voidaan transformoida siten, että ne saadaan jakautumaan syöpäsolujen tapaan. Solulinjat säilytetään jäädytettynä esimerkiksi nestetyppeen, jossa ne säilyvät elinkelpoisina odottamassa käyttöönottoa ja jakoa kasvatuspulloihin tai -maljoihin. (Freshney 2005, 40–41, 204; Jogdand 2007, 137.)

Ensimmäinen laboratorio-olosuhteissa kasvatettu solulinja oli L-929 (hiiren fibroplastisoluja), joka eristettiin vuonna 1948 (Sanford, Earle & Likely 1948, 229). Kun ensimmäinen ihmisperäinen solulinja, HeLa-solut (kohdunkaulan karsinoomasoluja), esiteltiin vuonna 1952 (Gey, Coffman & Kubicek 1952, 364), alkoi soluviljelyn voittokulku, joka jatkuu edelleen. Soluviljelyn käyttö sekä tutkimus- että tuotantotarkoituksiin on lisääntynyt jatkuvasti. Soluviljelyn avulla voidaan teollisesti valmistaa esimerkiksi rokotteita, vasta-aineita ja biolääkkeitä. (Lindl 2013, 1.) Kaupallisesti saata-

vat mediumit ja parantunut kontaminaatioiden kontrollointi ovat tehneet soluviljelystä osan rutiinomaista laboratoriotyöskentelyä (Jogdand 2007, 137).

1.1.1 Aseptiikka soluviljelystä

Soluviljely edellyttää huolellista työskentelyä ja hyvää aseptiikkaa. Mikäli aseptiikasta ei huolehdita asianmukaisesti, kontaminantit kuten virukset, sienet ja bakteerit voivat pilata viljelmän ja pahimmassa tapauksessa saastuttaa koko soluviljelylaboratorion. Mikro-organismien aiheuttamat kontaminaatiot ovatkin yksi soluviljelylaboratorion suurimmista haasteista. (Freshney 2005, 73.) Mikrobit kasvavat ja lisääntyvät usein eukaryoottisoluja helpommin ja voivat vallata viljelmän nopeasti vaikuttaen samalla solujen metaboliaan ja käyttäytymiseen. Kontaminoituneen viljelmän käyttö tutkimus- ja tuotantotarkoituksiin voi johtaa virheellisiin tuloksiin ja epäkelpoihin tuotteisiin. (Degeling, Maquire, Bovenberg & Tannous 2012, 4227.) Mikrobikontaminaatioiden ohella ristiinkontaminoituminen toisista solulinjoista on mahdollista. Ristiinkontaminoitunut soluviljelmä sisältää yhdestä tai useammasta toisesta solulinjasta peräisin olevia soluja. (Davis 2011, 107.) Erityisesti HeLa-solut ja muut nopeasti kasvavat solut voivat kontaminoida hitaammin kasvavia linjoja. Ristiinkontaminoitumista voidaan ehkäistä helposti käsittelemällä vain yhtä solulinjaa kerrallaan. (Freshney 2005, 319.)

Mahdollisuus aseptiseen työskentelyyn on otettava huomioon jo soluviljelytiloja suunniteltaessa. Suurten ja täysin steriilien tilojen ylläpito ei aina ole mahdollista eikä taloudellisesti järkevää, mutta niiden tulisi olla aina kuitenkin puhtaita, pölyttömiä ja kulkurajoitettuja. Laminaarikaappi on soluviljelylaboratorion ehdoton perusvaruste ja ainoa täysin steriili tila. (Freshney 2005, 43–48.) Laminaarikaappi tulee käynnistää hyvissä ajoin ennen työskentelyn aloittamista, jotta epäpuhtaudet ehtivät poistua ilmasta. HEPA-suodattimen avulla saadaan poistettua lähes kaikki bakteerit ilmasta. Kaapin pinnat ja kaikki sinne laitettavat välineet suihkutetaan etanolilla tai isopropanolilla ennen työskentelyä. Kontaminaatoriskin vuoksi laminaarikaapissa tulee pitää vain työskentelyn kannalta välttämättömiä tarvikkeita. (Philippeos, Hughes, Dhawan & Mitry 2012, 8).

Potentiaaliset kontaminantit pääsevät soluviljelylaboratorioon ja soluviljelmään mm. huoneilman, laboratoriohenkilökunnan tai epästeriilien liuosten ja työvälineiden kautta. Merkittävä osa kontaminaatioista on peräisin laboratorion työntekijöistä. Hyvä henkilökohtainen hygienia ja käsien

säännöllinen pesu vähentävät kontaminaatoriskiä. (Freshney 2005, 76, 208–209.) Työntekijöiden tulee käyttää asianmukaisia suojavarusteita, kuten työtakkia, suojakäsineitä ja tarpeen mukaan hengitysmaskia. Soluviljelytiloissa puhuminen ja aivastaminen vapauttavat kontaminoivia pisaroita huoneilmaan, joten niitä tulee välttää (Nikfarjam & Farzaneh 2011, 206.) Työskentelypinnat ja suojakäsineet tulee käsitellä esimerkiksi 70 % etanolilla säännöllisin väliajoin. Mahdolliset roiskeet työskentelypinnoilta tulee pyyhkiä välittömästi. (Philippeos ym. 2012, 8.) Soluviljelyssä käytettävät kaupalliset liuokset, kuten mediumit ja seerumit käyvät läpi tiukat laadunvarmistusprosessit. Liuokset voivat kuitenkin kontaminoitua käytön yhteydessä. Pullot tulee pyyhkiä esimerkiksi 70 % etanolilla ennen käyttöä ja sen jälkeen. Liuospulloon saa kastaa vain käyttämättömän steriilin pipetinkärjen. Kaatamista pullosta toiseen ei suositella mahdollisten kontaminaatioiden siirtymisen vuoksi. (Freshney 2005, 76–78.)

Aseptiikasta huolehtimisen lisäksi solulinjat tulisi käydä säännöllisesti läpi soveltuvalla menetelmällä, esimerkiksi PCR:lla, piilevien kontaminaatioiden kuten mykoplasman varalta. Kontaminoituneet solulinjat tulisi hävittää soluviljelylaboratoriosta välittömästi esimerkiksi autoklavoimalla kontaminaation leviämisen ehkäisemiksi. Myös kontaminaation lähteen selvittäminen on tärkeää, jotta kontaminaation toistumiselta välttyttäisiin. (Freshney 2005, 73, 312; Thraves & Rowe 2011, 279.)

1.1.2 Soluviljelylaboratorion laaduntarkkailu

Solulinjojen laaduntarkkailun tulisi vakiinnuttaa jo alusta lähtien osaksi tutkimusprojekteja ja tuotekehitysprosesseja. Tässä epäonnistuminen voi tulla kalliiksi rahan ja tieteellisen maineen suhteen. Monet tutkimusprojektit voivat johtaa tuotteen kaupallistamiseen, esimerkiksi diagnostiseksi reagenssiksi tai lääkekäyttöön. Tästä syystä on tärkeää, että laaduntarkkailumittauksia käytetään alusta asti sääntelyvirastojen vakuuttamiseksi ja tuotteen kaupallistamisen valmistelemiseksi. Olisi suositeltavaa, että soluviljelylaboratoriot sisällyttäisivät laadunvalvontaprosesseihinsa vähintään steriiliyden, mykoplasman ja solulinjan puhtauden laaduntarkkailun. (Clarke ym. 2011, 30; Thraves ym. 2011, 289.)

1.2 Mykoplasma

Mykoplasmat ovat pieniä, soluseinättömiä bakteereja, jotka kuuluvat mollikuuttien (*Mollicutes*) luokkaan. Mykoplasmoja on löydetty yli 120 lajia, ja niitä pidetään pienimpinä itsenäisesti lisääntyvinä mikro-organismeina. Mykoplasmojen erityisominaisuuksia ovat pieni genomin koko (noin 500 geeniä), soluseinän puute sekä yksinkertaisempi aineenvaihdunta kuin muilla bakteereilla. Fylogeneettisesti mykoplasmojen katsotaan kehittyneen gram-positiivisista bakteereista genomin pientymisen kautta. Yksinkertaisuudestaan huolimatta useat mykoplasma-lajit ovat merkittäviä patogeeneja sekä ihmisille että eläimille. Esimerkiksi ihmisillä epätavallinen keuhkokuume yhdistetään *Mycoplasma (M.) pneumoniae*-lajiin. (Razin 1997, 124; Schnee, Schulsse, Hotzel, Ayling, Nicholas, Schubert, Heller, Ehrlich & Sachse 2012, 1.)

1.2.1 Mykoplasmat soluviljelyssä

Mykoplasma on ollut tunnettu soluviljelykontaminantti jo tekniikan alkua ajoista lähtien. Soluviljelmän mykoplasmakontaminaatio havaittiin ensimmäisen kerran vuonna 1956 (Robinson, Wichelhausen & Roizman 1956, 1147). Robinson (1956) tutkimusryhmineen selvitti mykoplasman vaikutusta eukaryoottisoluihin, ja huomasi että myös negatiivisena kontrollina käytetyt solut olivat kontaminoituneet mykoplasmalla. Mykoplasmat ovatkin yksi yleisimmistä soluviljelyssä esiintyvistä kontaminanteista. Pienen kokonsa vuoksi ne pääsevät helposti suodattimien läpi ja soluseinän puutteesta johtuen ne sietävät soluseinään vaikuttavia antibiootteja (Hogg 2013, 202). Mykoplasmojen esiintyminen soluviljelyssä voi vääristää *in vitro* -kokeita, joten mykoplasmakontaminaatiot ovat suuri ongelma tutkijoille ja lääkeyhtiöille. (Schnee ym. 2012, 1). Kun mykoplasma infektoi soluviljelyn, se voi vaikuttaa lähes kaikkiin solun prosesseihin kuten aineenvaihduntaan, lisääntymiseen, geenien ilmentymiseen sekä kalvoproteiinien viestinvälitykseen (DesRochers ym. 2015, 1-2). Tästä syystä kontaminoitumattomien solulinjojen ylläpito on erittäin tärkeää kaikessa soluviljelyihin perustuvassa tutkimuksessa.

Soluviljelyiden kasvava käyttö tutkimustyössä ja bioteknologiassa sekä jatkuva samojen antibiootien käyttö rutiiniviljelyissä ovat oletettavasti johtaneet mykoplasmakontaminaatioiden määrän kasvuun (Drexler & Uphoff 2002, 76–77.) Mykoplasman aiheuttamat huomaamattomat kontaminaatiot ovat pysyneet suurena ongelmana soluviljelylaboratorioissa, sillä useat tutkimukset osoit-

tavat kontaminoituneiden soluviljelyiden määrien olevan arviolta 15–35% luokkaa kaikista soluviljelyistä. (DesRochers, ym. 2015, 2.)

Mykoplasmaalajeja on tunnistettu yhteensä yli 120, joista noin 20 lajia on löydetty myös soluviljelyistä. Yleisimpiä soluviljelykontaminantteina esiintyviä mykoplasmaalajeja ovat *M. arginini*, *M. pirum*, *M. orale*, *M. hominis*, *M. fermentans*, *M. salivarium* ja *Acholeplasma laidlawii*. Tavallisesti mykoplasmat kasvavat solujen kasvatusmediumissa tai kiinnittyvät viljeltävien solujen solukalvoille. (Gopalkrishna ym. 2007, 364.) *M. orale*, joka kuuluu ihmisen suun normaaliin flooraan, kattaa 20–40% kaikista soluviljelyiden mykoplasmakontaminaatioista. Myös ihmisen nielussa esiintyvät *M. fermentans* ja *M. hominis* ovat apatogeenisiä, soluviljelyitä helposti kontaminoivia lajeja. Laboratoriohenkilökunta onkin oletettavasti yksi suurimmista soluviljelyiden mykoplasmatartuntojen lähteistä. Kolmasosa kaikista soluviljelyiden mykoplasmakontaminaatioista on peräisin nautaeläimissä esiintyvistä mykoplasmaalajeista, kuten *M. arginini* ja *Acholeplasma laidlawii*. Nautaeläinten mykoplasmojen merkittävä osuus viittaa siihen, että viljelyissä käytettävät vasikan seerumit kuten FBS, voivat olla kontaminaatiolähteitä. 1960- ja 1970-luvuilla tehdyissä tutkimuksissa ilmeni, että 25–40 % soluviljelyissä käytetyistä vasikan seerumieristä oli kontaminoitunut jollain mykoplasmaalajilla. Viime vuosikymmeninä seerumiperäiset kontaminaatiot ovat kuitenkin merkittävästi vähentyneet tuottajien ennaltaehkäisyn ja testauksen ansiosta. (Drexler ym. 2002, 77–78.)

Tärkein kontaminaatiolähde solulinjoille ovat muut, jo valmiiksi mykoplasamalla kontaminoituneet solulinjat. Tämä johtuu infektoituneiden solulinjojen suuresta mykoplasmakonsentraatiosta, mykoplasmojen pitkällisestä selviämisestä kuivettuneena sekä helposta pisaranmuodostuksesta solujen käsittelyn aikana. Mykoplasmat voivat levitä solulinjasta toiseen laboratoriovälineiden, mediumin tai reagenssien kautta, mikäli ne ovat päässeet kontaminoitumaan infektoituneella solulinjalla. (Drexler ym. 2002, 78.)

1.2.2 Mykoplasmojen tunnistaminen soluviljelyistä

Mykoplasmojen havaitseminen soluviljelyistä on vaikeaa, sillä niitä ei pysty näkemään tavallisella mikroskoopilla, eivätkä ne aina aiheuta mediumin pH:n muutosta, kuten useat muut mikrobinit. Muihin bakteereihin verrattuna mykoplasmat lisääntyvät todella hitaasti jopa hyvissä kasvuolosuhteissa. Niiden jakautumisnopeus vaihtelee tunnista jopa yhdeksään tuntiin. Tästä syystä voi

kestää jopa yli viikon ennen kuin agar-maljalle saadaan näkyviä mykoplasmapesäkkeitä. (Drexler ym. 2002, 76; Gopalkrishna ym. 2007, 364.)

Mykoplasmojen tunnistamiseen soluviljelyistä on kehitelty useita tapoja: esimerkiksi mikrobiviljely, DNA:n leimaus fluorokromilla, polymeerasiketjureaktio (PCR), immunofluoresenssimenetelmä sekä DNA-hybridisaatio. Kaikissa näissä menetelmissä on omat rajoituksensa, heikkoutensa ja vahvuutensa. (Gopalkrishna ym. 2007, 364.) Mykoplasmojen biologinen moninaisuus ja nopea mukautuminen soluviljelyihin tekevät kaikkien mykoplasmakontaminaatioiden löytämisen yhdellä ainoalla menetelmällä vaikeaksi (Drexler & Uphoff 2005, 14).

1.2.3 Mykoplasmakontaminaatioiden torjunta

Parhaimmat ja tehokkaimmat tavat välttää mykoplasmakontaminaatioita soluviljelyissä ovat tarkka aseptisten työtapojen noudattaminen sekä pisaroiden muodostumisen kontrollointi. Lisäksi tulisi harkita uusien, ulkopuoliselta taholta saatujen solulinjojen testaamista ennen käyttöönottoa. (Nikafarjam & Farzaneh 2012, 210.)

Jos soluviljely on kontaminoitunut mykoplasamalla tai muulla mikrobilla, paras keino kontaminaatioiden poistoon on kontaminoituneen solulinjan hävittäminen. Myös kontaminaatiolähteen löytäminen ja eliminoiminen on tärkeää, jotta kontaminaatio ei toistuisi. Saastuneet mediumit ja muut liuokset tulee korvata uusilla ja puhtailla tuotteilla, työvälineet autoklavoida sekä tarpeen mukaan kouluttaa työntekijät uudelleen. (Thraves ym. 2011, 279.) Kontaminoituneen solulinjan autoklavoiminen on paras keino päästä eroon mykoplasmatartunnasta. Mikäli kontaminoituneet solut ovat uniikkeja tai arvokkaita, voi niitä yrittää pelastaa esimerkiksi antibiootikäsittelyn avulla. (Nikafarjam ym. 2012, 210.)

1.3 PCR-menetelmä mykoplasmojen tunnistamisessa soluviljelyistä

Mikrobiologisen viljelyn ajateltiin pitkään olevan kaikkein herkin ja spesifisin menetelmä mykoplasmakontaminaation havaitsemiseksi. Kuitenkin uudemmat, molekyylibiologiaan perustuvat menetelmät ovat lyöneet klassiset menetelmät herkkyydessä ja spesifisyydessä. Tällainen menetelmä on erityisesti polymeerasiketjureaktio (PCR). (Uphoff, Denkmann & Drexler 2012, 1.)

Polymeraasiketjureaktion peruseriaate on spesifisen DNA-pätkän (fragmentin) määrän lisääminen peräkkäisten, eksponentiaalisesti moninkertaistavien syklien kautta kunnes haluttua tuotetta on kertynyt riittävä määrä nähtäväksi. Jokainen lisääntymissykli koostuu kolmesta eri lämpötilasta, joissa PCR-reaktioseoksen ainekset käyvät läpi erilaisia fyysisiä ja biokemiallisia tapahtumasarjoja: denaturaatio, alukkeiden kiinnittyminen sekä pidentyminen. Nämä vaiheet saavat templaatti-DNA:n kopioitumaan. Ensimmäinen sykli on inkubointi 94 °C:ssa, jotta saadaan denaturoitua templaatti-DNA:n kaksoiskierteinen rakenne. Tätä seuraa alukkeiden kiinnittymisvaihe 55 °C:ssa, jossa alukkeet voivat kiinnittyä kohde-DNA:n komplementaarisiiin sekvensseihin. Syklin lopuksi on ekstensio eli pidentymisvaihe 72 °C:ssa, jossa polymeraasientsyymi pidentää templaatin alukkeesta suuntaan 5'-3' eli kopioi sen. (Harris 1998, 9.)

Siitä lähtien kun PCR-menetelmä keksittiin vuonna 1985, se on mullistanut molekyylibiologian maailmanlaajuisella tasolla. Yksi PCR-tekniikan parhaita puolia on, että sillä on suhteellisen helppoa löytää geneettistä tietoa. PCR ja muut molekyylibiologisten menetelmät voivat olla paljon spesifisempiä, herkempiä, monikäyttöisempiä, nopeampia ja turvallisempia kuin muut vaihtoehtoiset menetelmät erilaisissa tilanteissa. (Harris 1998, 3-4.)

PCR on osoittautunut erittäin herkäksi ja spesifiseksi menetelmäksi mykoplasma kontaminaatioiden tunnistamiseksi soluviljelyistä. Menetelmän etuina ovat myös sen nopeus, helppokäyttöisyys ja objektiivisuus tulosten tulkinnassa. PCR:lla monistetaan useimmiten mykoplasman ribosomaalista DNA:ta (16S rDNA). Tämä geenisekvenssi ei ole käynyt läpi merkittäviä mutaatioita. (Freshney 2005, 315.)

Spesifisyydestään ja nopeudestaan huolimatta PCR-menetelmälläkin on rajoituksensa, joista merkittävin on alttius reaktioita inhiboiville yhdisteille. Inhibiittoreita esiintyy lähes kaikissa biologisissa näyttemateriaaleissa, kuten elimistön nesteissä, kudoksissa, veressä, vedessä ja maaperässä. PCR-reaktiota inhiboivia yhdisteitä voi päätyä näytteeseen myös esikäsittelyprosessien, kuten esimerkiksi solujen hajotuksen, aikana tai jopa suojakäsineiden puuterista. Inhibiittoreihin lukeutuu hyvin erilaisia orgaanisia ja epäorgaanisia yhdisteitä kuten esimerkiksi sappisuolat, urea, etanoli sekä useat proteiinit, esimerkiksi IgG ja hemoglobiini. Inhibiittorit laskevat PCR-menetelmän herkkyyttä ja voivat johtaa jopa väärin negatiivisiin tuloksiin. Inhibiittorin konsentraatio näytteessä on ratkaisevassa merkityksessä reaktion inhiboitumisen kannalta. Useimmat inhiboivat yhdisteet estävät PCR-reaktioita onnistumasta vaikuttamalla suorasti tai epäsuorasti polymeraasientsyymien toimintaan: hajottamalla entsyymiä itseään tai sen kofaktoreita, matkimalla

nukleiinihappojen rakennetta tai sitoutumalla templaatti-DNA:han. Jotkin inhibiittoriyhdisteet voivat estää PCR-reaktiota jo annealing-vaiheessa estämällä alukkeiden sitoutumisen templaatti-DNA:han. (Ellenbroek L, John R, Schrader C ja Schielke A. 2012 1014–1021.)

2 PROJEKTIN LÄHTÖKOHDAT

ValiRX Finland Oy eli ValiFinn on Oulussa, Oulun ammattikorkeakoulun sosiaali- ja terveystieteiden yksikön tiloissa toimiva monikansallinen bioteknologia-alan yritys. ValiFinn tekee päätoimialanaan kehitystyötä esimerkiksi syövän hoitomuotojen etsimiseksi. ValiFinn:n omistaja on Lontoossa toimiva, syöpälääkekehitykseen erikoistunut lääkekehitysyritys Valirx Plc. Kehitystyön lisäksi ValiFinn tarjoaa laboratoriopalveluja yhteistyössä Oulun ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman kanssa. (ValiFinn 2015, viitattu 20.9.2015.) ValiFinn:lla oma soluviljelylaboratorio OAMK:n tiloissa. Yritys käyttää viljelemiään soluja tutkimus- ja kehitystyössä. Viimeisen vuoden aikana ValiFinn on käyttänyt solujaan esimerkiksi NAV3:n ja VAL201:n kehitystyössä.

Cordin ym. (2013, 1) mukaan herkkä ja luotettava menetelmä mykoplasmacontaminaatioiden tunnistamiseen on tärkeä osa laboratorion laaduntarkkailua ja sitä tulisi toteuttaa jokaisessa soluviljelylaboratoriossa. Opinnäytetyön lähtökohtana oli ValiFinn:n tarve löytää sopiva menetelmä solujensa rutiininomaiseen mykoplasmacontaminaukseen osana soluviljelylaboratorionsa laaduntarkkailua. ValiFinn halusi, että tässä opinnäytetyöprojektissa testataan PCR-menetelmää mykoplasmacontaminaatioiden havaitsemiseksi yrityksen solulinjoista. Yrityksellä ei ole tähän mennessä ollut rutiininomaisesti käytettävää menetelmää mahdollisten mykoplasmacontaminaatioiden tunnistamiseksi eikä ValiFinn:n soluja ole tiedettävästi testattu aiemmin mykoplasman varalta.

2.1 Projektin tarkoitus ja tavoitteet

Opinnäytetyöprojektissa viljeltiin ValiFinn:n syöpäsolulinjoja ja testattiin niistä mykoplasmacontaminaatiota PCR-menetelmällä. Projektin tarkoituksena oli selvittää PCR-menetelmän soveltuvuutta ValiFinn:n käyttöön syöpäsolujen mykoplasmacontaminausta varten. PCR-testaus toistettiin useita kertoja menetelmän luotettavuuden ja toistettavuuden arviointia varten.

Testauksessa käytettiin kahden eri valmistajan (Promokine ja Sigma-Aldrich) kaupallista PCR-kittiä ja verrattiin näiden toimivuutta keskenään. Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa ValiFinn:lle luotettavaa teoreettista ja käytännöllistä tietoa PCR-menetelmän käytöstä solulinjojen mykoplas-

matestauksessa osana soluviljelylaboratorion laaduntarkkailua. Projektin avulla pyrittiin saamaan vastaus seuraaviin kysymyksiin:

1. Soveltuuko PCR-menetelmä ValiFinn:n solulinjojen mykoplasmatestaukseen?
2. Kumpi testatuista PCR-kiteistä on parempi ValiFinn:n solulinjojen PCR-testaukseen, Promokinen Mycoplasma Detection Kit I/C vai Sigma-Aldrichin LookOut® Mycoplasma PCR Detection Kit?
3. Millä tavalla soluviljelymedium tulisi valmistaa näytteeksi, ettei siinä esiintyisi PCR-reaktiota inhiboivia yhdisteitä?

2.2 Projektiorganisaatio

Tämän opinnäytetyöprojektin tilaaja oli ValiRX Finland Oy. Laboratorion johtaja, biokemisti Jani Salmivaara (FM) toimi opinnäytetyön ohjaajana sekä asiantuntijana. Toisena ohjaajana ja asiantuntijana toimi Oulun ammattikorkeakoulun lehtori Paula Reponen (FT). Opinnäytetyötä ohjasi myös Oulun ammattikorkeakoulun tuntiopettaja Outi Mäkitalo (FT). Opinnäytetyön vertaisarvioijina toimivat bioanalytiikko-opiskelijat Saana Annala ja Anne-Maria Ylilauri. Projektiorganisaatio on esitetty kaaviossa 1.



KAAVIO 1. Projektiorganisaatiokaavio

2.3 Projektissa käytetyt PCR-kitit ja solulinjat

Projekti aloitettiin joulukuussa 2014 tutustumalla kaupallisesti saatavilla oleviin PCR-menetelmään perustuviin mykoplasmakontaminaatioiden tunnistamiseen tarkoitettuihin kitteihin. Valintaprosessissa kiinnitettiin huomiota kaupallisen kitin hinta-laatusuhteeseen, testikertojen määrään, kontrolleihin, säilyvyyteen sekä helppokäyttöisyyteen. Promokinen Mycoplasma Detection Kit I/C valittiin yhdessä opinnäytetyön tilaajan kanssa. Valitun kitin kanssa ilmeni kuitenkin PCR-reaktion inhiboitumista sekä kontrollien toimimattomuutta, joten myöhemmin keväällä 2015 vertailukohteeksi tilattiin Sigma-Aldrichin LookOut® Mycoplasma PCR Detection Kit.

Promokinen kitissä kaikki tarvittavat PCR-komponentit sisältävä Master Mix oli kylmäkuivattuna jauheena valmiina PCR-putkissa. Testiputkien sekä negatiivisena kontrollina käytettävien putkien Master Mix sisälsi PCR-reaktion tarvittavat alukkeet, nukleotidit (dATP, dCTP, dGTP ja dUTP), Hot-Start Taq DNA-polymeraasientyymien sekä sisäisen kontrolli-DNA:n. Positiiviset kontrolliputket

sisälsivät näiden ohella DNA-fragmentteja *Mycoplasma oralen* genomista. Lisäksi kittiin kuului rehydraatiopuskuri, johon kylmäkuivatut komponentit liuotettiin. Kitissä oli tarvikkeet 24 PCR-reaktion suorittamiseen.

Sigma-Aldrichin kitissä PCR-komponentit olivat Promokinen kitin tavoin kylmäkuivattuna jauheena valmiina putkissa lukuun ottamatta erikseen tilattavaa JumpStart™ Taq DNA-polymeraasientsyymiä. Testiputket sisälsivät alukkeet, nukleotidit, sisäisen kontrolli-DNA:n sekä latauspuskurin agarosigeelielektroforeesiajoa varten. Positiiviset kontrolliputket sisälsivät edellä mainittujen komponenttien lisäksi fragmentteja *M. oralen* genomista. Kittiin kuului myös rehydraatiopuskuri. Testauksissa käytettiin kitin suosittelemaa erikseen tilattavaa liukoista JumpStart Taq DNA-polymeraasia (Sigma-Aldrich), jonka yhdistettiin ohjeen mukaan rehydraatiopuskurin kanssa. Myös Sigma-Aldrichin kitissä oli materiaalit 24 PCR-reaktioon.

Aluksi testauksissa käytettiin kolmea syöpäsolulinjaa: LNCaP, PC-3 ja MCF-7. LNCaP-solut (Lymph Node Carcinoma of the Prostate -solut) ovat androgeeniriippuvaisia eturauhassyöpäsoluja, jotka on eristetty 50-vuotiaan miehen eturauhasen adenokarsinooman metastaasista vuonna 1977 (Horoszevich, Leong, Chu, Wajzman, Friedman, Papsidero, Kim, Chai, Kakati, Arya & Sandberg 1980, 115–132). PC-3-solut (Prostate Carcinoma 3 -solut) ovat myös eturauhassyöpäsoluja, jotka on eristetty eturauhassyövän luustometastaasista vuonna 1979 (Kaighn, Narayan, Ohnuki, Lechner & Jones 1979, 16–23). MCF-7-solut (Michigan Cancer Foundation 7 -solut) ovat rintasyöpäsoluja, jotka on eristetty rinnan adenokarsinoomasta vuonna 1973 (Soule, Vaquez, Long, Albert & Brennan 1973, 1409). Myöhemmin, kun Promokien Mycoplasma Detection Kit I/C:n rinnalle oli tilattu Sigma-Aldrichin LookOut® Mycoplasma PCR Detection Kit, testauksissa siirryttiin käyttämään ainoastaan LNCaP-solulinjaa ajan ja resurssien säästämiseksi.

3 TYÖVAIHEET

Opinnäytetyöprojektin laboriotyöskentely tapahtui ValiFinn:n soluviljelylaboratoriossa sekä Oulun ammattikorkeakoulun laboratoriotiloissa. Soluviljelylaboratoriossa oli laminaarikaappi, jossa kaikki solujen käsittely tapahtui sekä hiilidioksidi-inkubaattori, jossa soluja kasvatettiin. Tiloissa oli myös mikroskooppi, jolla viljeltyjä soluja pystyttiin tarkastelemaan. Soluviljelylaboratorion yhteydessä oli lämpöhaude, jolla esilämmitettiin soluviljelyssä käytettävät liuokset. Soluviljelyihin tarvittavat välineet, kuten kertakäyttöiset soluviljelypullot, falconputket sekä pipetinkärjet saatiin ValiFinn:ltä. Myös kasvatusmediumit (RPMI eli Roswell Park Memorial Institute -medium ja DMEM eli Dulbecco's Modified Eagle's Medium), trypsiini, penisilliini-streptomysiini-antibiootti sekä vasikan seerumi (FBS) olivat ValiFinn:n tarjoamia. Osa PCR-testauksista tehtiin Oulun ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman Techne TC-4000 PCR-laitteella ja osa ValiFinn:n VWR DuoCycler PCR-laitteella. Työssä käytetty elektroforeesi-ajolaitteisto oli Oulun ammattikorkeakoulun omistama.

3.1 Alkuvalmistelut

Soluviljelytyöskentely aloitettiin autoklavoimalla solujen pesuun käytettävä PBS-liuos sekä hiilidioksidi-inkubaattorin tarvitsema deionisoitu vesi. Myös hiilidioksidi-inkubaattori steriloidtiin ennen käyttöön ottamista inkubaattorin omalla autoklavointiohjelmalla. PCR-työskentelyä varten autoklavoitiin eppendorf-putkia, pipetinkärkiä sekä deionisoitua vettä negatiivista ja positiivista kontrollireaktiota varten. Solujen kasvatusmedium valmistettiin inaktivoimalla mediumiin lisättävän vasikan seerumin (FBS) ja inkuboimalla sitä puoli tuntia 56 °C vesihauteessa. Inkuboinnin jälkeen seerumi suodatettiin ja jaettiin 50 ml:n eriin falcon-putkiin ja pakastettiin. RPMI- ja DMEM-mediumpulloihin lisättiin 5 ml penisilliini-streptomysiini antibioottia. Promokinen Mycoplasma Detection Kit I/C:n ohjeena oli viljellä soluja ainakin kahden jaon verran ilman mykoplasmaan tehoavia antibiootteja. Penisilliini-streptomysiini ei tehoa mykoplasmaan, joten sitä voitiin käyttää viljelyssä.

3.2 Soluviljelyt

Ennen soluviljelytyöskentelyn aloittamista laminaarikaapin annettiin olla päällä vähintään puoli tuntia, jotta epäpuhtaudet ehtivät poistua ilmasta. Laminaarikaappi puhdistettiin 70 % etanolilla ennen ja jälkeen työskentelyn. Lisäksi kaikki laminaarikaappiin laitettavat työvälineet sumutettiin etanolilla. Viljelyissä käytettävät liuokset esilämmitettiin +37 °C vesihauteessa noin puoli tuntia ennen käyttöä. Mediuumeista valmistettiin käyttövalmiita 50 ml:n eriä (10 % FBS RPMI/DMEM) muutaman päivän tarpeiksi kerrallaan yhdistämällä 45 ml mediumia ja 5 ml vasikan seerumia (FBS) falconputkiin.

Solulinjat olivat säilöttyinä ampulleissa nestetyppeen. Ampullit sulatettiin 37 °C vesihauteessa ja solut jaettiin kahteen kasvatuspulloon (liite 1). Solujen kasvuastetta tarkasteltiin mikroskooppilla päivittäin. Kun solut olivat jakaantuneet niin paljon, että ne täyttivät 90–100 % kasvatuspullon pinta-alasta, solut jaettiin uusiin kasvatuspulloihin (liite 1). Ennen näytteiden valmistusta kutakin solulinjaa jaettiin vähintään kaksi kertaa.

Solujen käsittelyyn liittyvissä tilanteissa, kuten sulatuksessa ja jakamisessa, tuli noudattaa erittäin hyvää aseptiikkaa solujen kontaminoimisen välttämiseksi. Laminaarikaapin käytön sekä käyttötarvikkeiden ja työskentelypintojen etanolidesinfektoinnin lisäksi aseptiikkaa lisäsi kertakäyttötavaroiden, kuten kasvatuspullojen, falcon-putkien, pipetinkärkien sekä kertakäyttöisten käsinien käyttö. Suojakäsineet suihkutettiin 70 % etanolilla ennen työskentelyä ja niitä vaihdettiin useaan otteeseen työskentelyn lomassa. Solujen käsittelyyn liittyvään aseptiikkaan kuuluu tärkeänä osana myös työntekijän oma hygienia, joten ennen viljelyiden aloittamista työskentelyssä käytettävät laboratoriotakit pestiin. Kaikki työskentely soluviljelylaboratoriossa tapahtui juuri pestyin käsin ja pitkät hiukset kiinnitettynä. Ulkovaatteita tai –kenkiä ei tuotu soluviljelytiloihin.

3.3 Näytteiden valmistus

Kun solut olivat kasvaneet 90–100 % kasvatuspullojen pinta-alasta, niistä valmistettiin näytteet PCR-reaktioita varten. Näytemateriaalina käytettiin mediumia, jossa solut olivat kasvaneet. Näytteiden valmistuksessa kokeiltiin neljää eri menetelmää tavoitteena löytää menetelmä, jonka avulla

PCR:ta inhiboivista tekijöistä päästäisiin eroon. Työssä käytetyt näytteentekomenetelmät on esitelty taulukossa 1.

TAULUKKO 1. Näytteiden valmistusmenetelmät

Menetelmä	Työohje
Kasvatusmediumin kuumentaminen	100 µl mediumia kuumennetaan mikrosentrifugiputkessa 95 °C:ssa 10 min.
Kasvatusmediumin mykoplasmapitoisuuden konsentroiminen	1 ml mediumia sentrifugoidaan mikrosentrifugiputkessa 500 x g 5 min. Supernatantti siirretään puhtaaseen mikrosentrifugiputkeen ja sentrifugoidaan 14 000 x g 15 min. Sentrifugoinnissa muodostunut (jos positiivinen näyte) mykoplasmapelletti resuspensoidaan 100 µl:aan DNA-vapaata vettä.
DNA:n eristys	Machery-Nagelin NucleoSpin® Blood -kitin ohjeen mukaan (liite 2)
DNA:n laimennos	Machery-Nagelin NucleoSpin® Blood -kitillä eristetystä DNA:sta tehdään 1:100 laimennos DNA-vapaaseen veteen.

Ensimmäisissä testauksissa (kuviot 1-3) näytteet valmistettiin vain mediumin kuumennusmenetelmällä eli kuumentamalla mikrosentrifugiputkessa 100 µl solujen kasvatusmediumia 95 °C:ssa 10 minuutin ajan. Kuumentamisessa käytettiin PCR-laitetta, jolle tehtiin oma ohjelma näytteiden inkubointia varten. Kuumennusmenetelmän mukainen näytteentekotapa oli ohjeena sekä Promokinen Mycoplasma Detection Kit I/C:ssä että Sigma-Aldrichin LookOut® Mycoplasma PCR Detection Kit:ssä. Kuumennusmenetelmällä valmistetut näytteet säilyivät jääkaappilämpötilassa yli viikon myöhemmin suoritettavaa PCR-reaktioita varten. Ennen PCR-reaktiota näytteet sentrifugoitii nopeasti (5 s) mikrosentrifugissa.

Promokinen Mycoplasma Detection Kit I/C:ssä oli yllä kuvatun kuumennusmenetelmän lisäksi myös vaihtoehtoinen näytteentekomenetelmä, jolla voitiin konsentroida näytteen mahdollista mykoplasmapitoisuutta. Menetelmää käytettiin myös Sigma-Aldrichin kitillä tehtäville näytteille. Tällä

tavalla tehdyille näytteille PCR-reaktio tuli suorittaa välittömästi tai kuumentaa vielä näytteet kuumentusmenetelmän mukaisesti säilytystä varten.

Sekä Promokinen Mycoplasma Detection Kit I/C että Sigma- Aldrichin LookOut® Mycoplasma PCR Detection Kit suosittelivat DNA:n eristyksen suorittamista, mikäli näytteissä ilmenee PCR-reaktioita inhiboivia tekijöitä. Kolmantena näytteentekomenetelmänä projektissa käytettiin DNA:n eristämistä. Eristyksessä käytettiin Macherey-Nagelin kaupallista DNA:n, RNA:n ja proteiinien puhdistamiseen tarkoitettua NucleoSpin® Blood –kittiä. Koska eristetty DNA sisälsi runsaasti solujen omaa genomista materiaalia, neljäntenä näytteentekomenetelmänä käytettiin vielä eristetyt DNA:n 1:100 laimennosta.

3.4 Polymeraasiketjureaktio (PCR)

Promokinen Mycoplasma Detection Kit I/C:lle PCR-näytteet valmistettiin lisäämällä 2 µl näytettä ja 23 µl rehydraatio-puskuria reaktioputkeen. Positiiviseen ja negatiiviseen kontrolliin lisättiin 2 µl DNA-vapaata vettä ja 23 µl rehydraatio-puskuria (taulukko 2). Näytteet ja kontrollit sekoitettiin varovaisesti reaktioputkea naputtelemalla ja niiden annettiin inkuboitua huoneenlämmössä 5 minuuttia, jotta kylmäkuivatut komponentit liukenivat puskuuriin. Tämän jälkeen ne olivat valmiit PCR-reaktioon. Promokinen Mycoplasma Detection Kit I/C:n sisältämien PCR-putkien kylmäkuivatut ainekset olivat toisinaan levinneet putkien seinämille. Tästä syystä putket sentrifugoitiin mikrosentrifuugissa ennen pipetointeja, jotta kaikki kylmäkuivattu aines saatiin PCR-putkien pohjalle ja näin niiden suhde säilyi oikeana.

TAULUKKO 2. Pipetointikaavio Promokinen Mycoplasma Detection Kit I/C:llä

	Näyte	Positiivinen kontrolli	Negatiivinen kontrolli
Rehydraatiopuskuri	23 µl	23 µl	23 µl
Näyte	2 µl		
DNA-vapaa vesi		2 µl	2 µl

Sigma-Aldrichin LookOut® PCR Mycoplasma Detection Kit:n kanssa käytetyn Jumpstart Taq DNA-polymeraasin konsentraatio oli 2,5 yksikköä/μl, ja sitä tarvittiin jokaiseen PCR-reaktioon 0,5 μl:a. PCR-näytteitä varten valmistettiin cocktail Taq-DNA-polymeraasista ja rehydraatiopuskurista: 0,5 μl Taq DNA-polymeraasia + 22,5 μl rehydraatiopuskuria/reaktio. PCR-putkiin pipetoitiin 2 μl näytettä ja 23 μl Cocktailia. Kontrollit valmistettiin pipetoimalla positiiviseen kontrolliin 25 μl Cocktailia ja negatiiviseen 2 μl DNA-vapaata vettä ja 23 μl cocktailia (taulukko 3). Näytteet ja kontrollit sekoitettiin varovasti naputtamalla ja inkuboitiin huoneenlämmössä 5 minuuttia ennen PCR-reaktiota.

TAULUKKO 3. Pipetointikaavio Sigma-Aldrichin LookOut® Mycoplasma PCR Detection Kit:llä

	Näyte	Positiivinen kontrolli	Negatiivinen kontrolli
Rehydraatiopuskuri + Taq DNA-polymeraasi (cocktail)	23 μl	25 μl	23 μl
Näyte	2 μl		
DNA-vapaa vesi			2 μl

Molempien kittien näytteille tehtiin sama PCR-ohjelma:

1. 94 °C 2 minuuttia (Taq DNA-polymeraasin aktivaatio)
2. 94 °C 30 sekuntia (denaturaatio)
3. 55 °C 30 sekuntia (annealing eli alukkeiden sitoutuminen)
4. 72 °C 40 sekuntia (ekstensio eli templaatti-DNA:n pidentyminen)

Kohtia 2-4 toistettiin 40 sykliä.

3.5 Agaroosigeelielektroforeesi

Promokinen kitin näytteitä varten valmistettiin 1,7 % agaroosigeeli ja Sigma-Aldrichin kitin näytteitä varten 1,2 % agaroosigeeli. Lisäksi geelejä ja elektroforeesiajoa varten valmistettiin 10 X TBE-puskuria. Ajopuskuri ja geelit valmistettiin ValiFinn:n ohjeiden mukaan (liitteet 3 ja 4). Jokaisella geelillä ajettiin näytteiden lisäksi positiivinen ja negatiivinen kontrolli. Kutakin näytettä ja kontrollia pipetoitiin agaroosigeelin näytekaivoihin 18 μl ja niitä ajettiin 80 V:n jännitteellä ja 40 A:n sähkö-

virralla noin 1,5 tuntia. Jokaisessa geeliajossa käytettiin Promokinen kaupallista RTU DNA Ladder I (100bp) -molekyylipainomarkkeria, jota pipetoitiin näytekaivoon 5 µl. Agaroosigeelielektroforeesin ajopuskurina käytettiin 1 X TBE-liuosta. Ajot pysäytettiin kun näytteet olivat edenneet geelillä 2-3 cm. Ajon jälkeen tulokset luettiin geeliltä UV-valossa.

3.6 Jätteiden käsittely

Kaikki soluviljelyissä käytetyt kertakäyttöiset esineet, kuten pipetinkärjet, solujen kasvatuspullot sekä solujätettä sisältäneet falcon-putket steriloitiin ensin autoklavoimalla, jonka jälkeen ne hävitettiin sekajätteinä. Samalla tavoin hävitettiin myös työssä käytetyt soluviljelmät. Jokaisesta eri viljelykerrasta muodostui kasvatusmediumia, PBS-pesuliuosta, trypsiiniä sekä kuolleita soluja sisältävää nestemäistä jätettä, joka hävitettiin sekoittamalla joukkoon reilusti 70 % etanolia ja kaatamalla kaatoaltaaseen runsaan veden kanssa. Agaroosigeeli sisälsi etidymbromidia, joka on karsinogeeninen yhdiste. Kaikki projektin aikana valmistetut agaroosigeelit kerättiin yhteen ja laitettiin haihdutettavien jätteiden vetokaappiin.

4 TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Opinnäytetyöprojektimme tarkoituksena oli testata PCR-menetelmää ValiFinn:n solulinjojen mykoplasmatestaukseen. Testauksessa käytettiin kahden eri valmistajan kaupallista PCR-kittiä ja neljää erilaista näytteentekotapaa, jotka on esitelty taulukossa 1. Ensimmäisissä testauksissa viljeltiin ja testattiin Promokinen Mycoplasma Detection Kit I/C:llä kolmea solulinjaa (LNCaP, PC-3 ja MCF-7), mutta myöhemmin PCR-testauksissa käytettiin vain LNCaP -solulinjaa materiaalien säästämiseksi. Ensimmäisissä PCR-testauksissa käytettiin Oulun ammattikorkeakoulun PCR-laitetta, Techne TC-4000 (kuviot 1 ja 2). PCR-laittekohtaisten erojen testaamiseksi osa ajoista tehtiin ValiRX Finland Oy:n VWR DuoCycler PCR-laitteella (kuviot 3-7).

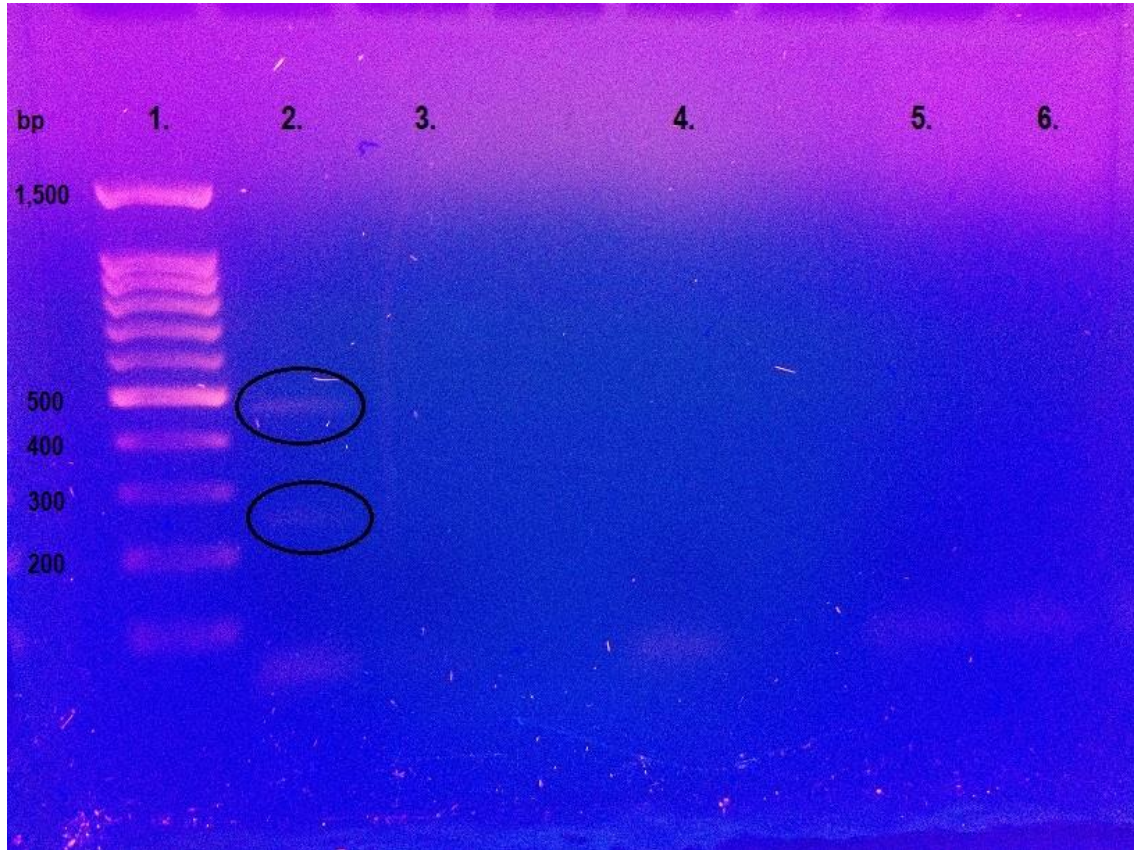
4.1 PCR-testausten tulokset ja kittien käyttökokemukset

Onnistuneessa PCR-reaktiossa positiivisessa kontrollissa tulisi näkyä raita 270 bp:n kohdalla. Mykoplasmapositiivisissa näytteissä tulisi kontaminaation määrästä riippuen näkyä vahva tai heikko positiivinen raita 270 bp:n kohdalla. Promokinen kitillä negatiivisessa kontrollissa tulisi näkyä raita 479 bp:n kohdalla ja Sigma-Aldrichin kitillä 481 bp:n kohdalla. Kaikissa näytteissä, lukuun ottamatta erittäin vahvaa mykoplasmakontaminaatiota, tulisi näkyä sisäinen kontrolliraita 479–481 bp:n kohdalla. Mikäli sisäinen kontrolliraita ei tule näkyviin, PCR-reaktio on epäonnistunut.

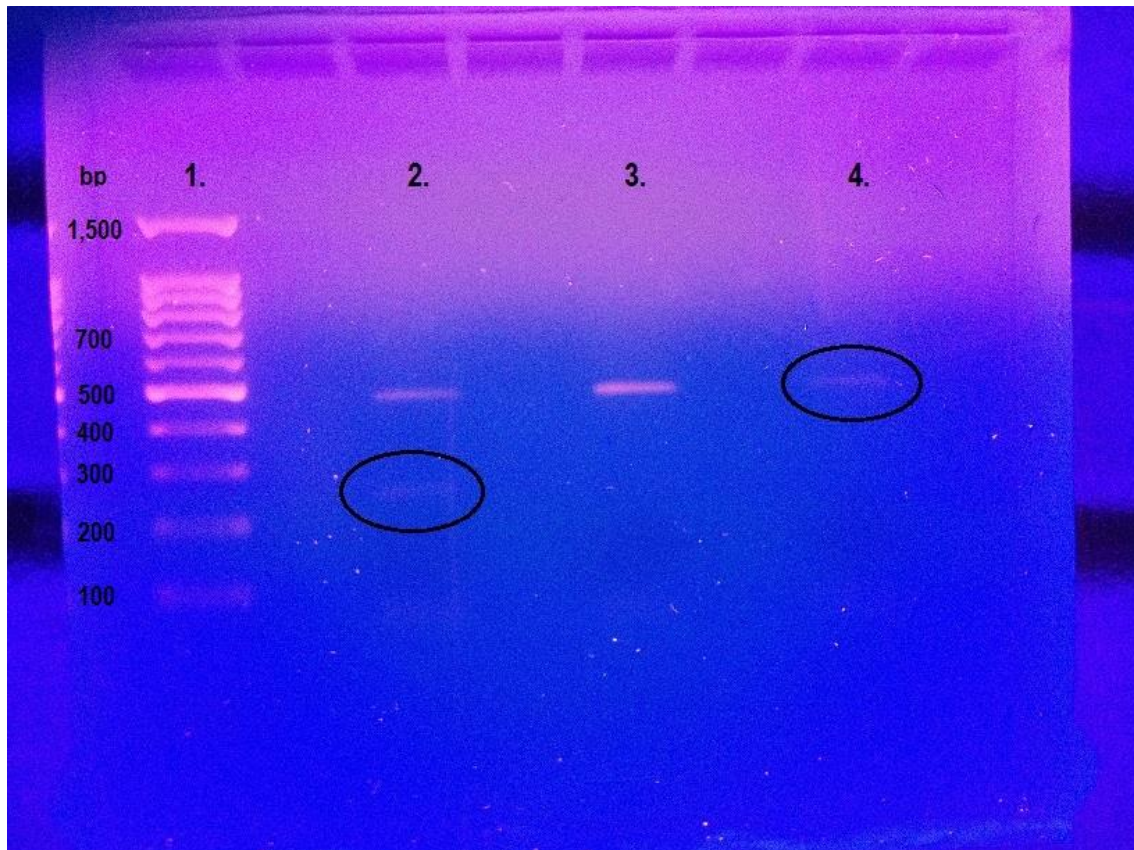
Promokinen Mycoplasma Detection Kit I/C oli helppokäyttöinen, koska kaikki PCR-komponentit olivat valmiina PCR-putkissa. Putkiin tarvitsi lisätä vain rehydraatiopuskuri ja näyte. Varsinaisen PCR-reaktion onnistumisessa esiintyi vaihtelevuutta. Ongelmia ilmeni erityisesti kontrollien onnistumisessa. Välillä positiivinen kontrolli näkyi hailakasti (kuvio 2) ja toisinaan kontrollit inhiboituivat täysin (kuviot 1, 4 ja 6). Myös näytteille tapahtui inhiboitumista (kuvio 1).

Ensimmäisissä testauksissa (kuviot 1 ja 2) näytteet tehtiin kuumentamalla solujen kasvatusmediumia 95 °C 10 minuuttia. Näin tehdyt näytteet voitiin säilyttää jääkaapissa noin viikon ajan myöhempää PCR-ajoa varten. Eri sulatusajankohdista ja solujen kasvunopeudesta johtuen soluviljelyt olivat valmiita näytteiksi eri päivinä, joten kuumennusmenetelmä oli näytteen säilyvyyden perus-

teella paras eri solulinjojen yhtäaikaiseen testaamiseen. Koska näytteet säilyivät viikon ajan jääkaapissa, eri solulinjojen soluille pystyttiin ajamaan PCR samana päivänä.



KUVIO 1. Promokine Mycoplasma Detection Kit I/C. 1) RTU DNA Ladder I, 2) positiivinen kontrolli, 3) negatiivinen kontrolli, 4) LNCaP näyte, 5) PC-3 näyte, 6) MCF-7 näyte. Näytteet on tehty kuumentamismenetelmällä. Tulos: Positiivinen kontrolli näkyy geelillä heikosti 270 sekä 479 bp:n kohdalla, negatiivinen kontrolli sekä näytteet ovat inhiboituneet.



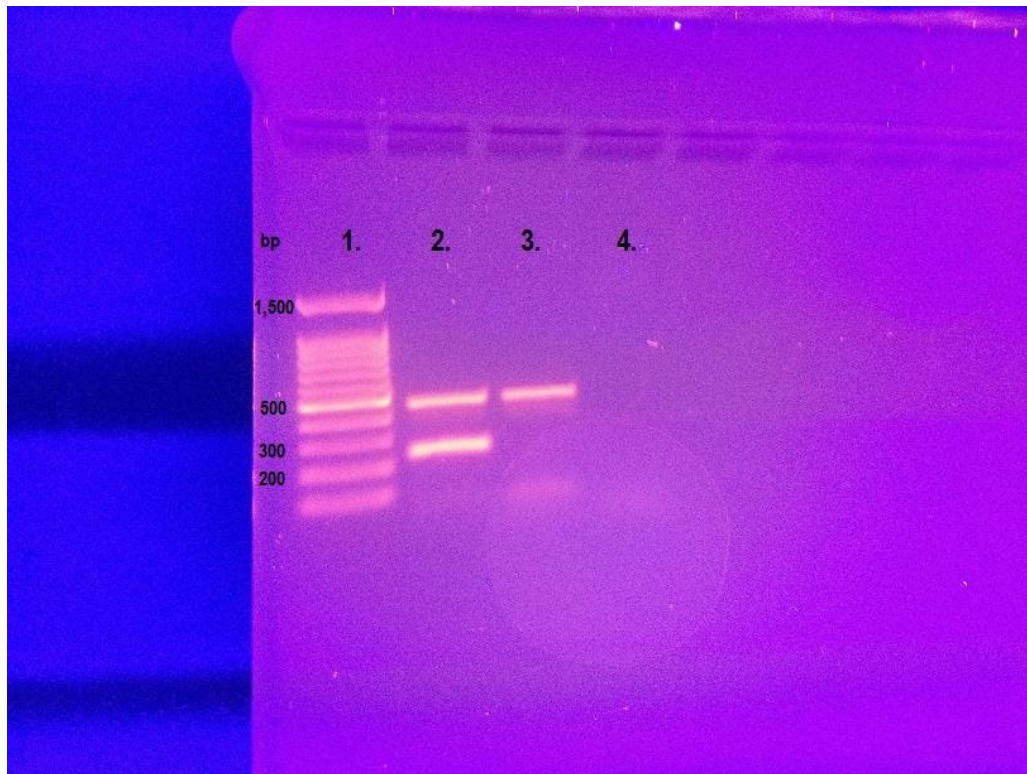
KUVIO 2. Promokine Mycoplasma Detection Kit I/C. 1) RTU DNA Ladder I, 2) positiivinen kontrolli, 3) negatiivinen kontrolli, 4) LNCaP näyte, tehty kuumennusmenetelmällä. Tulos: positiivinen kontrolli näkyy hyvin haaleasti 270 bp:n kohdalla, negatiivinen kontrolli on onnistunut ja näkyy selvänä 479 bp:n kohdalla. Näytteen sisäinen kontrolli näkyy haaleasti 479 bp:n kohdalla.

Promokinen Mycoplasma Detection Kit I/C:llä tehtyjen testauksien tuloksia, jotka on esitetty kuvioissa 1 ja 2, ei voinut luotettavasti tulkita, koska kitin kontrollit toimivat joko heikosti tai eivät lainkaan. Tästä syystä sen rinnalle tilattiin toinen kaupallinen PCR-kitti, Sigma-Aldrichin LookOut® Mycoplasma PCR Kit. Toista kittiä testaamalla pystyttiin arvioimaan, johtuivatko ongelmat Promokinen kitistä itsestään vai esimerkiksi virheellisistä työtavoista, kuten pipetointivirheistä tai kontaminaatioista.

Sigma-Aldrichin LookOut® Mycoplasma PCR Detection Kit:n PCR-putket sisälsivät kaikki PCR-reaktioon tarvittavat komponentit DNA-polymeraasientsyymiä lukuun ottamatta. PCR-reaktioita varten piti tilata erikseen Sigma-Aldrichin JumpStart Taq DNA-polymeraasi, jota kitissä suositeltiin. Sigma-Aldrichin kitillä tehdyt PCR-näytteet tehtiin melkein samalla kaavalla kuin Promokinen, mutta erillisestä DNA-polymeraasista johtuen PCR-reaktioita varten tuli DNA-polymeraasista ja

rehydraatiopuskurista valmistaa erillinen cocktail, jota sitten pipetoitiin jokaiseen PCR-putkeen. Käytännössä cocktailin valmistaminen ei ollut kovin suuri työ, joten molempien kittien käyttö oli PCR-näytteiden valmistamisen osalta suunnilleen yhtä yksinkertaista. Hyvää Sigma-Aldrichin PCR-putkissa Promokinen putkiin verrattuna oli se, että Sigma-Aldrichin PCR-putkissa kylmäkuivatut komponentit eivät takertuneet putkien seinämiin, vaan ne olivat tiiviinä palloina putkien pohjalla. Tämän ansiosta pipetointia edeltävää putkien sentrifugointia ei tarvinnut suorittaa.

Sigma-Aldrichin kitillä kontrollit toimivat jokaisessa PCR-ajossa, eli positiivisessa kontrollissa näkyi sisäinen kontrolliraita 481 bp:n kohdalla sekä selkeä positiivinen raita 270 bp:n kohdalla. Kuviossa 3 on esitetty ensimmäisen Sigma-Aldrichin LookOut® Mycoplasma PCR Detection Kit:llä tehdyn PCR:n tulokset. Positiivisessa kontrollissa näkyi kirkas raita 270 bp:n kohdalla ja negatiivisessa kontrollissa näkyi sisäinen kontrolliraita 481 bp:n kohdalla. Näyte, joka tässä testiajossa oli LNCaP -solulinjaa ja valmistettu kuumennusmenetelmällä, oli sen sijaan inhiboitunut eli sisäinen kontrolliraita ei tullut näkyviin.



KUVIO 3. Sigma-Aldrich LookOut® PCR Detection Kit. 1) RTU DNA Ladder I, 2) positiivinen kontrolli, 3) negatiivinen kontrolli, 4) kuumennusmenetelmällä tehty LNCaP -näyte. Tulos: Positiivinen kontrolliraita näkyy selkeästi 270 bp:n kohdalla ja negatiivinen kontrolli näkyy selkeästi 481 bp:n kohdalla. LNCaP näyte on inhiboitunut.

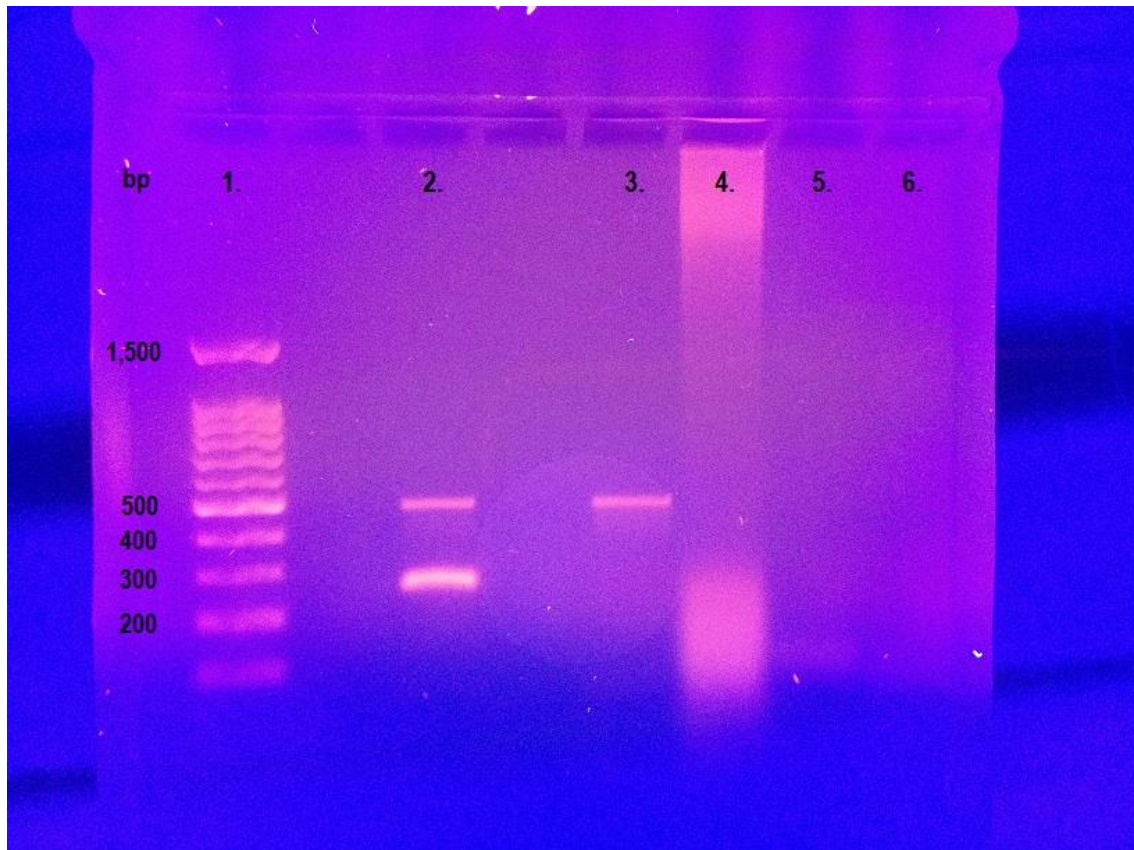
Sigma-Aldrichin kaupallinen kitti onnistui kontrollien suhteen, mutta kuumennusmenetelmällä tehdyn näytteen sisäinen kontrolliraita ei tullut 481 bp:n kohdalla näkyviin eli PCR ei ollut onnistunut (kuvio 3). Tästä päätellen näytemateriaali sisälsi PCR:a inhiboivia tekijöitä. Kittien mukaan DNA:n eristys oli erittäin suositeltavaa tehdä, mikäli näytemateriaali sisältäisi PCR-inhibiittoreita, joten yhdeksi näytteentekomenetelmäksi otettiin DNA:n eristys (taulukko 1, liite 2). DNA eristettiin kasvatusmediumista, jossa oli joukossa LNCaP -soluja. Eristetystä DNA:sta tehtiin näytteet molemmille kiteille. Eristetyn DNA-näytteen rinnalla ajettiin Promokinen kitille mykoplasmaa konsentroivalla menetelmällä tehty näyte ja Sigma-Aldrichin kitille kuumennusmenetelmällä tehty näyte. Lisäksi molemmille kiteille tehtiin näytteet puhtaasta kasvatusmediumista, jotta voitaisiin arvioida, sisältääkö solujen kasvatuksessa käytettävä medium PCR-inhibiittoreita.

Kuvioissa 4 ja 5 esitetyissä ajoissa käytettiin näytemateriaalina mediumia LNCaP-solujen kasvatuspullostasta. Promokinen kitissä ilmeni jälleen ongelmaa kontrollien kanssa, sillä positiivinen kont-

rolli oli inhiboitunut (kuvio 4). Negatiivinen kontrolli sen sijaan oli tällä kertaa onnistunut, kuten myös näytteiden sisäiset kontrollit. Eristetty DNA sisälsi niin paljon solujen omaa genomista materiaalia, että geeliltä ei pystynyt erottamaan PCR-tuotteita (kuvio 4). Koska myös pelkkää mediumia sisältävässä näytteessä näkyi sisäinen kontrolli (kuvio 4), tämän ajon perusteella kasvatusmediumin ei pitäisi sisältää PCR-inhibittoreita. Sigma-Aldrichin kitillä tehdyssä ajossa mediumnäyte sen sijaan oli inhiboitunut (kuvio 5). Sigma-Aldrichin kitti toimi kontrollien osalta luotettavasti. Eristetystä DNA:sta tehdyn näytteen tulosta ei tältäkkään geeliltä voitu tulkita, koska solujen omaa genomista materiaalia oli liikaa. Kuumentamalla tehty näyte sekä pelkkä mediumnäyte olivat inhiboituneet (kuvio 5).



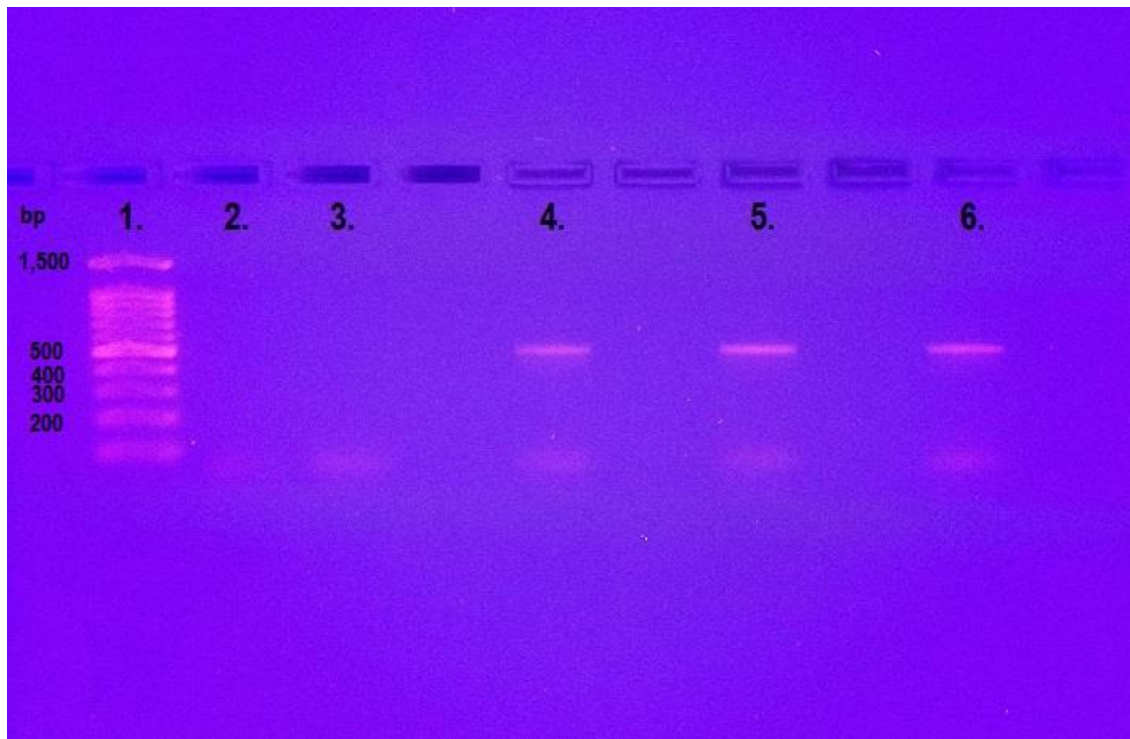
KUVIO 4. Promokine Mycoplasma Detection Kit I/C. 1. RTU DNA Ladder I, 2. positiivinen kontrolli, 3. negatiivinen kontrolli, 4. eristetty DNA, 5. pelkkä kasvatusmedium 6. konsentroimalla tehty näyte. Tulokset: Positiivinen kontrolli on inhiboitunut. Negatiivisen kontrollin, pelkän mediumin ja konsentroimalla tehdyn näytteen PCR on onnistunut eli sisäinen kontrolliraita näkyy geelillä. Eristetyssä DNA-näytteessä PCR-tuotteet eivät näy geelillä, koska solujen omaa genomista materiaalia on liikaa.



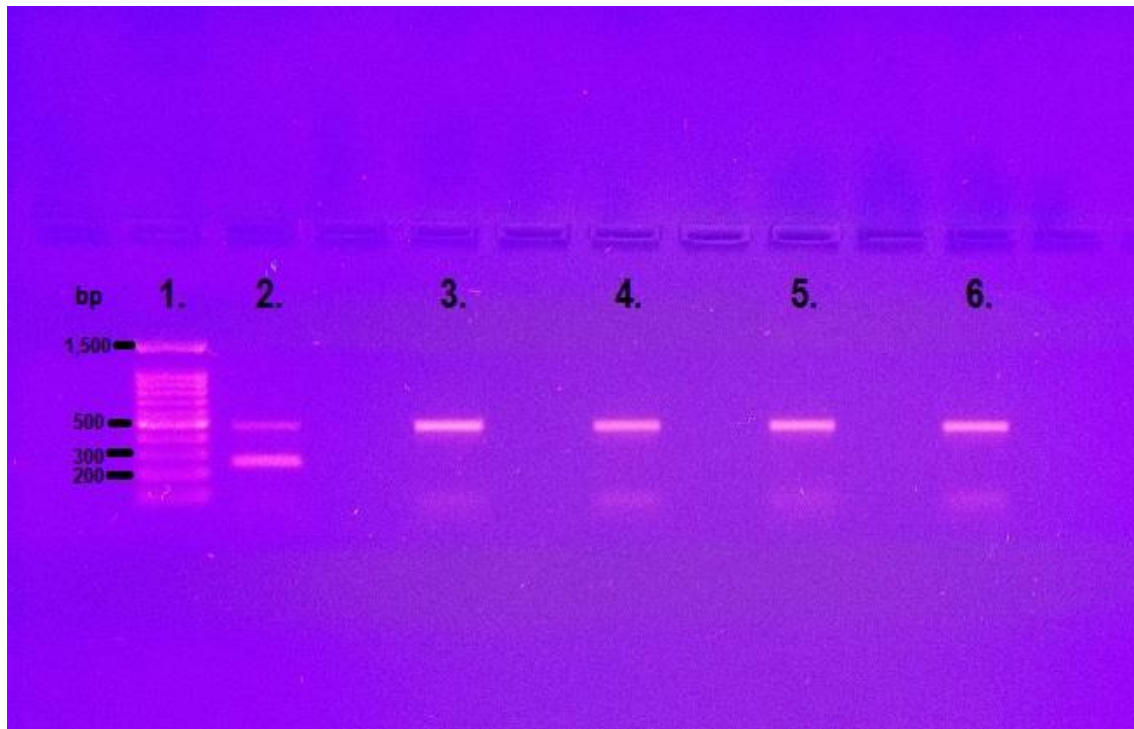
KUVIO 5. Sigma-Aldrich LookOut® PCR Detection Kit. 1. RTU DNA ladder I, 2. positiivinen kontrolli, 3. negatiivinen kontrolli, 4. eristetty DNA, 5. pelkkä medium 6. kuumentamalla tehty näyte. Tulokset: positiivinen kontrolliraita näkyy kirkkaasti 270 bp:n kohdalla. Negatiivisessa kontrollissa näkyy sisäinen kontrolliraita 481 bp:n kohdalla. DNA:ta eristämällä tehty näyte sisältää niin paljon solujen omaa DNA:ta, että PCR-tuotteita ei pysty geeliltä näkemään. Kuumentamalla tehty näyte ja pelkkä medium ovat inhiboituneet.

Eristetty DNA-näyte sisälsi niin paljon LNCaP -solujen omaa genomista materiaalia, että PCR-tuotteita ei pystytty geeliltä havaitsemaan. Jotta eristetystä DNA:sta saataisiin vähennettyä solujen oman genomisen materiaalin määrää, viimeistä ajoa varten molemmille kiteille tehtiin näytteiksi vielä eristetyn DNA:n 1:100 laimennos DNA-vapaaseen veteen. Laimennetun DNA-näytteen rinnalla ajettiin vertailun vuoksi myös muilla näytteentekotavoilla tehtyjä näytteitä. Molemmille kiteille valmistettiin laimennetun DNA:n ohella näytteet mykoplasmaa konsentroivalla tavalla ja Sigma-Aldrichille kuumentamalla solumediumia 95 °C:ssa 10 minuuttia.

Promokinen kitille valmistettiin kaksi positiivista kontrollia, koska kitin kontrollinäytteiden toimiminen erityisesti positiivisten kontrollien suhteen oli ollut aiemmissa ajoissa epävarmaa. Kuitenkaan kummankaan positiivisen kontrollin PCR-reaktio ei onnistunut eli geelillä ei näkynyt raitaa 270 bp:n eikä 479 bp:n eli sisäisen kontrollin kohdalla (kuvio 6). Negatiivisessa kontrollissa sekä kaikissa näytteissä näkyi selkeä sisäinen kontrolliraita (kuvio 6). Sigma-Aldrichin kitillä kontrollit toimivat halutulla tavalla, eli positiivisessa kontrollissa näkyi positiivinen raita 270 bp:n kohdalla ja sisäinen kontrolliraita 481 bp:n kohdalla (kuvio 7). Eristetystä DNA:sta 1:100 laimennetuissa näytteissä solujen oman genomisen materiaalin määrä oli vähentynyt niin, että PCR-tuotteet voitiin havaita geeliltä. DNA:ta laimentamalla, kasvatusmediumia kuumentamalla ja mykoplasmaa konsentroimalla tehtyjen näytteiden PCR-reaktiot olivat onnistuneet. Kuviossa 7 näkyvä Sigma-Aldrichin kitillä tehty PCR-testaus oli täysin onnistunut, sillä kontrollit toimivat ja mikään näyte ei ollut inhiboitunut.



KUVIO 6. Promokine Mycoplasma Detection Kit I/C. 1. RTU DNA Ladder I, 2. positiivinen kontrolli, 3. positiivinen kontrolli, 4. negatiivinen kontrolli, 5. laimennettu DNA-näyte ja 6. konsentroimalla tehty näyte. Tulokset: molemmat positiiviset kontrolli ovat inhiboituneet. Negatiivinen kontrolli, eristetyn DNA:n laimennosnäyte sekä konsentroimalla tehty näyte ovat onnistuneet ja niissä näkyy sisäinen kontrolliraita 479 bp:n kohdalla.



KUVIO 7. Sigma-Aldrich LookOut® PCR Detection Kit. 1. RTU DNA Ladder I, 2. positiivinen kontrolli, 3. negatiivinen kontrolli, 4. eristety DNA:n 1:100 laimennos, 5. kuumentamalla tehty näyte, 6. konsentroimalla tehty näyte. Tulokset: Positiivinen kontrolli on onnistunut eli siinä on kirkas raita 270 bp:n kohdalla. Negatiivinen kontrolli sekä kaikki näytteet ovat onnistuneet ja niissä näkyy sisäinen kontrolliraita 481 bp:n kohdalla.

4.2 Tulosten yhteenveto

Opinnäytetyöprojektin kautta saatiin vastaus projektille asetettuihin kysymyksiin, jotka on esitetty luvussa 2.1. Taulukkoon 4 on koottu tiivis yhteenveto testauksissa saaduista tuloksista sekä Promokinen Mycoplasma Detection Kit I/C:llä että Sigma-Aldrichin LookOut® Mycoplasma PCR Detection Kit:llä. Kaikkiaan PCR-menetelmän voidaan todeta olevan nopea ja helppokäyttöinen menetelmä ValiFinn:n soluviljelynäytteiden mykoplasmatestaukseen, sillä koko testaus näytteenvalmistuksesta elektroforeesiajoon on mahdollista suorittaa yhden työpäivän aikana, kunhan soluja on ensin viljelty vaadittava aika. Sigma-Aldrichin kittiä voidaan pitää luotettavampana, sillä kontrollit onnistuivat jokaisessa ajossa. Promokinen kontrollien PCR ei useimmiten onnistunut, jonka takia näytteiden tulosten tulkinta oli epävarmaa. Eri näytteentekomenetelmillä saatiin yhteisiä tuloksia molemmilla kiteillä. Parhaimmiksi menetelmiksi osoittautuivat Promokinen kitissä

esitelty mykoplasmaa konsentroiva näytteentekotapa sekä 1:100 laimennettu eristetty DNA. Näillä tavoilla tehdyissä näytteissä PCR onnistui eli sisäinen kontrolli näkyi geelillä käytetystä kitistä riippumatta. Kaikkien onnistuneiden PCR-reaktioiden perusteella voidaan sanoa, että LNCap solulinjalla ei ole mykoplasmakontaminaatiota, sillä onnistuneissa näytteissä tuli aina näkyviin pelkästään sisäinen kontrolliraita.

TAULUKKO 4. Yhteenveto tuloksista

Kontrolli/näytteentekomenetelmä	Promokine Mycoplasma Detection Kit I/C	Sigma-Aldrich LookOut® Mycoplasma PCR Detection Kit
Positiivinen kontrolli	<i>Luotettavuus heikko</i>	<i>Luotettava</i>
Negatiivinen kontrolli	<i>Luotettavuus heikko</i>	<i>Luotettava</i>
Kuumennusmenetelmä	<i>Inhiboitumista esiintyi</i>	<i>Inhiboitumista esiintyi</i>
Mykoplasman konsentroimismenetelmä	<i>PCR onnistunut</i>	<i>PCR onnistunut</i>
DNA:n eristys	<i>Solujen oma genominen materiaali häiritsee tulkintaa</i>	<i>Solujen oma genominen materiaali häiritsee tulkintaa</i>
Eristetyn DNA:n 1:100 laimennos	<i>PCR onnistunut</i>	<i>PCR onnistunut</i>

4.3 Johtopäätökset

Projektin kautta selvisi, että solujen mykoplasmatestaus PCR-menetelmällä on suhteellisen nopea ja yksinkertainen toteuttaa, mutta soluista valmistetut näytteet voivat sisältää PCR-reaktioita inhiboivia tekijöitä. Kittikohtaista vaihtelua ilmeni muun muassa kontrollien onnistumisessa sekä näytteentekotavassa ja tämän kautta PCR:n inhiboitumisessa. Jokainen PCR-testaus pyrittiin suorittamaan samalla tavalla, mutta PCR-näytteiden valmistuksessa käytettiin neljää erilaista näytteentekotapaa: kasvatusmediumin kuumentaminen, DNA:n eristys, DNA:n eristyksen 1:100 laimennos sekä mykoplasman konsentroiminen sentrifugoimalla ja sekoittamalla DNA-vapaaseen veteen. Näytteentekomenetelmät on esitelty tarkemmin taulukossa 1.

Promokinen Mycoplasma Detection Kit I/C:llä ja Sigma-Aldrichin LookOut® Mycoplasma Detection kit:llä oli molemmilla omat hyvät ja huonot puolensa. Promokinen kitti oli erittäin helppokäyttöinen, sillä kaikki PCR-reaktioon tarvittavat komponentit olivat kylmäkuivattuna PCR-putkissa, jol-

loin niihin tarvitsi lisätä vain näyte ja rehydraatio-puskuri. Sigma-Aldrichin kittiä varten DNA-polymeraasi jouduttiin tilaamaan erikseen ja PCR-testauksia varten rehydraatio-puskurista ja polymeraasientsyymistä tuli valmistaa cocktail, jota pipetoitiin PCR-putkiin. Promokinen kitissä hyvää oli helppokäyttöisyyden lisäksi Sigma-Aldrichia edullisempi hinta. Kontrollien huonon toimimisen vuoksi Promokinen kitin PCR-tuloksia ei pystynyt luotettavasti tulkitsemaan vaikka itse näytteiden PCR-reaktiot olisivat onnistuneet. Sigma-Aldrichin kitti oli kalliimpi, mutta positiivinen ja negatiivinen kontrolli onnistuivat jokaisessa testauksessa hyvin.

Näytteentekomenetelmistä kasvatusmediumin kuumennus ja mykoplasman konsentroiminen olivat Promokinen kitin suosittelemia. Näistä mahdollista mykoplasmapitoisuutta konsentroiva näytteentekomenetelmä toimi hyvin sekä Promokinen että Sigma-Aldrichin kitille, koska sillä tavalla tehty näyte ei koskaan inhiboitunut. Kasvatusmediumin kuumennus oli ainut näytteentekomenetelmä, jota Sigma-Aldrichin kitti suositteli, mutta tällä tavalla tehdyt näytteet inhiboituivat usein sekä Promokinen että Sigma-Aldrichin kittiä käytettäessä. Näin ollen Promokinen kitissä hyvää oli myös sen tarjoama hyvä näytteentekomenetelmä.

PCR-näytteiden inhiboitumisen vuoksi yhtenä näytteentekomenetelmänä käytettiin DNA:n eristystä. Sekä Promokinen että Sigma-Aldrichin kitit suosittelivat DNA:n eristämistä, mikäli solut olivat kasvaneet enemmän kuin 90-100% kasvupinta-alastaan. Promokinen kitin mukaan inhiboitumista voi esiintyä myös liian korkean seerumi, proteiini- tai pakastusmediumpitoisuudesta, jolloin DNA:n eristys on suositeltavaa. Kiteissä ei kuitenkaan ollut tarkempaa ohjetta, kuinka käsitellä näytettä DNA:n eristämisen jälkeen. Eristetty DNA-näyte sisälsi niin paljon solujen omaa genomista materiaalia, että PCR-tuotteita ei pystynyt geeliltä lukemaan. Eristetyn DNA:n laimentaminen DNA-vapaaseen veteen 1:100 laimennoksella vähensi solujen oman genomisen materiaalin määrää sen verran, että PCR-tuotteet saatiin näkymään geelillä. DNA:n eristämisessä jäi kuitenkin mietittävään se, että olisiko jokin toisenlainen DNA:n eristyskitti tai -ohje ollut sellainen, jonka avulla olisi voitu eristää pelkästään mykoplasman omaa DNA:ta. Tällöin laimentamista ei tarvitsisi suorittaa.

Kaikki testatut solut olivat tiedettävästi mykoplasma-negatiivisia ja kaikista inhiboitumattomista PCR-näytteistä saatiinkin negatiivinen tulos. Testauksista ei täysin selvinnyt, mikä aiheutti näytteiden ja kontrollien inhiboitumisen. Kasvatusmediumista kuumentamalla tehdyt näytteet inhiboituivat usein, mikä voisi viitata siihen, että solujen kasvatuksessa käytettävä medium sisältää jotain PCR-reaktioita inhiboivia tekijöitä. Tätä tukee se, että mykoplasmaa konsentroivalla mene-

telmällä tehdyt näytteet eivät inhiboituneet millään testikerralla ja ne koostuivat pääasiassa DNA-vapaasta vedestä mediumin sijaan. Kuitenkin, testatessamme pelkkää puhdasta solujen kasvatusmediumia näytteenä, Promokinen kitillä tehty mediumnäyte ei inhiboitunut (kuvio 4) kun taas Sigma-Aldrichin kitillä inhiboitui (kuvio 5). Promokinen kontrollien, erityisesti positiivisten kontrollien toimimattomuus jäi epäselväksi, sillä ne tehtiin jokaisella ajokerralla samalla tavalla kitin ohjeen mukaan. Joko kitin positiiviset kontrollit olivat jostain syystä vialliset, tai sitten kontrollien valmistuksessa tapahtui toistamiseen virheitä, jotka saivat aikaan PCR:n inhiboitumisen. Yksi syy Promokinen positiivisten kontrollien toimimattomuuteen voi olla myös kylmäkuivatun aineksen ja rehydraatiopuskurin väärä suhde, koska Promokinen PCR-putkien kylmäkuivattua ainesta oli usein kertynyt putken seinämille ja välttämättä kaikki aines ei tästä syystä päässyt liukenemaan puskuriin.

5 POHDINTA

Opinnäytetyöprojekti oli mielenkiintoinen, haastava ja erittäin opettavainen. Työn tärkeimpänä tehtävänä oli selvittää, soveltuuko PCR-menetelmä ValiFinn:n käyttöön solulinjojen mykoplasma-testauksessa. Menetelmän soveltuvuutta ja toimivuutta kokeiltiin useilla testauksilla, joilla pyrittiin löytämään paras ja luotettavin näytteentekotapa PCR-reaktiota varten. Toisena tehtävänä oli verrata kahden eri valmistajan mykoplasmatestaukseen tarkoitettujen PCR-kittien toimivuutta keskenään ja tällä tavoin antaa tietoa ValiFinn:lle, kumpaa heidän tulevaisuudessa kannattaisi testauksessa käyttää. Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa ValiFinn:lle luotettavaa tietoa PCR-menetelmän käytöstä ja käytännöllisyydestä soluviljelyiden mykoplasmatestauksessa. Tavoitteena oli myös, että he voisivat tämän opinnäytetyön avulla arvioida, onko PCR-menetelmä sopiva heidän käyttämiensä solulinjojen rutiininomaiseen mykoplasmatestaukseen osana soluviljelylaboratorion laaduntarkkailua.

Opinnäytetyön kautta selvisi, että PCR-menetelmä on kätevä ja nopea testausmenetelmä mykoplasmakontaminaatioiden tunnistamiseen soluviljelyistä, kunhan PCR-näytteiden valmistukseen löydetään toimiva näytteentekotapa, jossa näytemateriaali ei inhiboi PCR-reaktiota. Suorittamissamme PCR-testauksissa parhaiksi näytteentekotavoiksi osoittautuivat menetelmät, jossa mahdollista mykoplasmapitoisuutta konsentroidaan Promokinen Mycoplasma Detection Kit I/C:n ohjeen mukaisella tavalla sekä eristetyn DNA:n 1:100 laimentaminen. Mediumin kuumennusmenetelmä, jota molemmat käytetyt kitit ohjeissaan suosittelivat, osoittautui helposti PCR-reaktioita inhiboivaksi. Tällä menetelmällä tehty näyte valmistettiin yksinkertaisesti kuumentamalla mediumia, jossa solut olivat kasvaneet, 95 °C 10 minuutin ajan. Solujen kasvatusmediumilla saattaa olla PCR-reaktioita inhiboiva vaikutus, sillä esimerkiksi mykoplasmaa konsentroivassa menetelmässä, jonka kanssa inhiboitumista ei esiintynyt, lopullinen näyte sisältää mediumin sijaan DNA-vapaata vettä. Eristetty DNA-näyte ilman laimennosta sisälsi liikaa solujen omaa genomista materiaalia, minkä takia geeliltä ei pystynyt lainkaan erottamaan PCR-tuotteita.

DNA:n eristäminen vaatii oman kittinsä sekä vie lisää aikaa mykoplasmatestauksen suorittamisesta, joten mykoplasmaa konsentroiva näytteentekomenetelmä on tällä perusteella paras menetelmä testauksen suorittamiseen. Kuitenkin, jos mykoplasmaa konsentroivalla näytteentekomenetelmällä tehty näyte inhiboituu, on DNA:n eristäminen ja laimentaminen suositeltavaa. DNA:n eristämällä saadaan tehokkaasti poistettua mahdolliset inhiboivat yhdisteet (Drexler ym. 2005,

22). Testauksissa käytetyistä PCR-kiteistä Sigma-Aldrichin LookOut® Mycoplasma PCR Detection Kit osoittautui paremmaksi, koska kitin positiivinen ja negatiivinen kontrolli toimivat jokaisessa testauksessa hyvin. Sigma-Aldrichin PCR-kitin ohjeessa oli näytteenteko-ohjeena pelkästään mediumin kuumennusmenetelmä, mutta opinnäytetyön tuloksien perusteella olisi suositeltavaa käyttää testaukseen jotain muuta menetelmää, kuten esimerkiksi mykoplasmaa konsentroivaa menetelmää, joka esiteltiin Promokinen kitin ohjeessa. Promokinen Mycoplasma Detection Kit I/C oli kontrollien toimimattomuuden takia epäluotettava, mutta positiivista oli sen ohjeesta löytynyt, parhaimmaksi osoittautunut mahdollista mykoplasmaa konsentroiva näytteentekomenetelmä. Syitä Promokinen kitin kontrollien toimimattomuuteen on vaikea sanoa. Ajoittain kontrollit toimivat hyvin ja ajoittain taas eivät. Kontrollien liuottaminen rehydraatiopuskuriin suoritettiin joka kerta samalla tavalla: kylmäkuivatut komponentit sentrifugoitiin putken pohjalle ja suspensoitiin varovaisesti rehydraatiopuskuriin.

Testaamamme solut olivat negatiivisia mykoplasman suhteen. Olisi mielenkiintoista testata PCR-menetelmää tiedettävästi mykoplasamalla kontaminoituneella solulinjalla, koska tällä voitaisiin saada selville, kuinka helposti positiivinen PCR-raita tulee näkyviin ja onko erilaisilla näytteentekomenetelmillä vaikutusta esimerkiksi raidan vahvuuteen. Tällaista testausta ei ole kuitenkaan mahdollista toteuttaa, koska mykoplasamalla kontaminoituneen solulinjan käsittely soluviljelylaboratoriossa infektoidella herkästi muita siellä kasvatettavia solulinjoja ja voi saastuttaa koko soluviljelylaboratorion.

Sekä soluviljelytekniikka että PCR ovat hyvää aseptiikkaa ja tarkkuutta vaativia menetelmiä, ja siksi oli työn käytännön suorittamisen kannalta hyvä, että molemmat menetelmät olivat meille bioanalytiikan opintojen kautta jo ennestään tuttuja. Pyrimme noudattamaan kaikissa laboratorio-työskentelyvaiheissa hyvän käytännön mukaista laboratoriotyöskentelyä eli GLP-työskentelyä (Good Laboratory Practice). Emme kuitenkaan voi sulkea pois mahdollisuutta, että osa näytteiden inhiboitumisista johtui esimerkiksi pipetointivirheistä tai PCR-putken kontaminoitumisesta. Virheelliset työskentelytavat voivat kontaminoida PCR-putkia ja näin aiheuttaa PCR-reaktion inhiboitumisen.

Olemme projektin kautta saaneet oppia paljon uutta soluviljelystä ja PCR-tekniikasta sekä näiden ohella myös projektityöskentelystä. Opinnäytetyön kautta olemme saaneet kokemusta tutkimusprojektin suunnittelusta ja toteuttamisesta. Olemme ymmärtäneet, kuinka tärkeää on perehtyä aiheen taustatietoihin ja suunnitella työvaiheet huolellisesti. Jos omassa projektissamme olisim-

me esimerkiksi tienneet DNA:n eristyksen merkityksen PCR:n onnistumisen kannalta, olisimme harkinneet sen tekemistä jo ensimmäisiä PCR-ajoja varten. Opinnäytetyö on antanut meille kokemusta tutkimusprojektin suorittamisesta ja laboratoriomenetelmän testaamisesta, joista voimme hyötyä tulevaisuudessa esimerkiksi työelämässä.

LÄHTEET

Bernet, C., Garret, M., de Barbeyrac, B., Bebear, C. & Bonnet, J. 1989. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 27 (11), 2492.

Clarke, S & Dillon, J. 2011. *The Cell Culture Laboratory*. Teoksessa J. Davis (toim.) *Animal Cell Culture. Essential Methods*. West Sussex: John Wiley & Sons, 1-31.

Davis, J. 2011. Basic Techniques and Media, the Maintenance of Cell Lines and Safety. Teoksessa J. Davis (toim.) *Animal Cell Culture. Essential Methods*. West Sussex: John Wiley & Sons, 91-151.

Degeling H, Maguire C, Bovenberg S & Tannous B. 2012. A simple and sensitive assay for mycoplasma detection in mammalian cell culture. *Analytical Chemistry*. 84(9), 4227–4232.

DesRochers, T. M., Kuo, I. Y., Kimmerling, E. P., Ehrlich, B. E. & Kaplan, D. L. 2015. The Effects of Mycoplasma Contamination upon the Ability to Form Bioengineered 3D Kidney Cysts. *PLoS ONE* 10 (3), 1-11.

Drexler, H. & Uphoff, C. 2002. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* 39 (2), 75-90.

Drexler, H. & Uphoff, C. 2005. Detection of Mycoplasma Contaminations. Teoksessa C. Helgason & C. Miller (toim.) *Methods in Molecular Biology. Basic Cell Culture Protocols*. Totowa: Humana Press, 13-23.

Drexler, H. & Uphoff, C. 2013. Detection of Mycoplasma Contaminations. Teoksessa C. Helgason & C. Miller (toim.) *Basic Cell Culture Protocols*. Vancouver: Springer Science, 1-14.

Ellenbroek L, Johne R, Schrader C & Schielke A. 2012. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* 113 (5), 1014-1026.

Freshney, R.I. 2005. Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique. New Jersey: John Wiley & Sons.

Gey G., Coffman W. & Kubicek M. 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer Research. 12(4), 264-265.

Gopalkrishna, V., Verma, H., Kumbhar, N. S., Tomar, R. S. & Patil, P. R. 2007. Detection of Mycoplasma Species in Cell Culture by Pcr and Rflp Based Method: Effect of Bm-Cyclin to Cure Infections. Indian Journal of Medical Microbiology 25 (4), 364-368.

Harris, E. 1998. Low-Cost Approach to PCR: Appropriate Transfer of Biomolecular Techniques. Cary, North Carolina: Oxford University Press.

Hogg, S. 2013. Essential Microbiology (2nd Edition). Somerset: John Wiley & Sons.

Horoszevich, J., Leong, S., Chu, T., Wajzman, Z., Friedman, M., Papsidero, L., Kim, J., Chai, L., Kakati, S., Arya, S. & Sandberg A. 1980. The LNCaP cell line – a new model of studies on human prostatic carcinoma. Teoksessa G. Murphy (toim.) Models for Prostate Cancer. New York: Alan R. Liss, 115-132.

Jogdand, S.N. 2007. Advances in Biotechnology. Mumbai: Himalaya Publishing House.

Kaighn, M., Narayan, K., Ohnuki, Y., Lechner, J. & Jones L. 1979. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). Investigative Urology 17 (1), 16-23

Lindl, T. & Steubing, R. 2013. Atlas of Living Cell Culture. Weinheim: John Wiley & Sons.

Niemi, M., Virtanen I. & Vuorio, E. 1994. Solu- ja molekyylibiologia. Porvoo: WSOY.

Nikfarjam, L. & Farzaneh, P. 2012. Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. Cell Journal 13 (4), 203-212.

Philippeos C., Hughes R., Dhawan A., Mitry R. 2012. Introduction to Cell Culture. Teoksessa R. Mitry & R. Hughes (toim.), Human Cell Culture Protocols, Totowa: Humana Press, 1-13.

Razin, S. 1997. The minimal cellular genome of mycoplasma. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics 34 (1-2), 124-130.

Robinson, L., Wichelhausen R., & Roizman B. 1956. Contamination of human cell cultures by pleuropneumonia-like organisms. Science 124 (1), 1147-1148

Sambrook, J. & Russel, D. 2001. Molecular Cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanford K, Earle W. & Likely G. 1948. The growth *in vitro* of single isolated tissue cells. Journal of the National Cancer Institute. 9 (3), 229-246.

Schnee, C., Schulsse, S., Hotzel, H., Ayling, R. D., Nicholas, R. A. J., Schubert, E., Heller, M., Ehricht, R. & Sachse, K. 2012. A Novel Rapid DNA Microarray Assay Enables Identification of 37 Mycoplasma Species and Highlights Multiple Mycoplasma Infections. PLoS ONE 7 (3), 1-10.

Soule, H., Vasquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. Journal of the National Cancer Institute 51 (1), 1409-1416.

Thraves, P. & Rowe, C. Detection and Cure of Contamination. 2011. Teoksessa J. Davis (toim.) Animal Cell Culture. Essential Methods. West Sussex: John Wiley & Sons, 255-296.

Uphoff, C., Denkmann, S. & Drexler, H. G. 2012. Treatment of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures with Plasmocin. Journal of Biomedicine & Biotechnology 2012 1-8.

ValiFinn. 2015. Tietoja yrityksestä. Viitattu 17.9.2015. <http://valifinn.com/etusivu/>

LIITTEET

Liite 1. Soluviljelyohje

Liite 2. DNA:n eristys –työohje (NucleoSpin® Blood, Machery-Nagel)

Liite 3. Liuosten valmistusohjeet

Liite 4. Agarosigeelin valmistusohje

Solujen sulatus nestetypistä

- Sulatetaan soluampulli 37 °C vesihautteessa
- Siirretään solut 15 ml falcon-putkeen
- Lisätään 10 ml mediumia
- Sentrifugoidaan 4 min 1000 rpm
- Suspensoidaan solupelletti 3-4 ml:aan mediumia
- Jaetaan kahteen kasvatuspulloon, joissa mediumia lopputilavuuteen 10 ml

Solujen ylläpito

- Poistetaan vanha medium
- Pestään kahdesti 1x PBS:llä (pikkupullo 7 ml/ iso pullo 10 ml)
- Lisätään Trypsiini-EDTA (pikkupullo 2 ml/ iso pullo 4 ml)
- Inkuboidaan 5 min 37 °C
- Lisätään 10 ml mediumia ja siirretään falcon putkeen
- Sentrifugoidaan 4 min 1000 rpm
- Suspensoidaan solupelletti 3-4 ml:aan mediumia
- Jaetaan 1:2 tai 1:3 uusiin kasvatuspulloihin, joissa mediumia lopputilavuuteen 10 ml
- Kasvatus 37 °C

- Reagenssien esivalmistelu: Proteinaasi K Liuotetaan proteinaasipuskuriin ja etanoli lisätään B5-pesupuskuriin. BE-eluutiopuskuri esilämmitetään + 70 °C vesihauteessa.
- Solut lasketaan mikroskoopilla Bürkerin kammiossa. Enintään 5×10^6 solua resuspendoidaan 200 µl:n PBS-liuosta.
- Solujen hajotus: Pipetoidaan 25 µl Proteinaasi K:ta ja 200 µl solususpensioita 1,5 µl:m mikrosentrifuugiputkeen. Lisätään putkeen 200 µl B3-puskuria. Sekoitetaan vortex-sekoittajassa 10-20 s.
- Inkuboidaan + 70 °C vesihauteessa 10-15 min.
- Lisätään 210 µ etanolia (96-100%) ja sekoitetaan vortex-sekoittajassa
- DNA:n sitominen: Asetetaan NucleoSpin® Blood-pylväs keräysputkeen. Ladataan näyte pylvääseen ja sentrifugoidaan 1 min 11 000 x G. Pipetoidaan supernatantti keräysputkesta jäteastiaan.
- 1. pesu: Asetetaan NucleoSpin® Blood –pylväs takaisin keräysputkeen ja lisätään 500 µl BW-pesupuskuria. Sentrifugoidaan 1 min 11 000 x G. Pipetoidaan supernatantti keräysputkesta jäteastiaan.
- 2. pesu: Asetetaan NucleoSpin® Blood- pylväs takaisin keräysputkeen ja lisätään 600 µl B5-pesupuskuria. Sentrifugoidaan 1 min 11 000 x G. Pipetoidaan supernatantti keräysputkesta jäteastiaan.
- Pylvään kuivaus: Asetaan NucleoSpin® Blood –pylväs takaisin keräysputkeen ja sentrifugoidaan 1 min 11 000 x G.
- DNA:n keräys mikrosentrifuugiputkeen: Asetetaan NucleoSpin® Blood –pylväs puhtaanseen 1,5 µl:n mikrosentrifuugiputkeen ja 100 µl esilämmitettyä BE-eluutiopuskuria. Inkuboidaan huoneenlämmössä 1 min ja sentrifugoidaan 1 min 11 000 x G.
- Eristetty DNA säilytetään pakastettuna (-20 °C) mikrosentrifuugiputkessa

0,5 M EDTA-liuoksen (200 ml) valmistusohje:

- Punnitaan 37,224 g Titriplex-jauhetta analyysivaa'alla ja liuotetaan dekantterissa 150 ml:an milliQ vettä. Koko tilavuutta milliQ vettä ei lisätä kerralla, koska pH:n säätöä varten tulee jättää varaa.
- EDTA-liuoksen pH säädetään haluttuun arvoon 5M NaOH-liuoksella. EDTA-liuos asetetaan magneettisekoittajalle ja pasteur-pipetillä lisätään 5M NaOH:a. pH:n muutosta seurataan pH-mittarilla. EDTA alkaa liueta veteen vasta, kun pH on lähellä 8:aa, jolloin liuos muuttuu maitomaisesta kirkkaaksi. Liuos siirretään mittapulloon pH:n ollessa haluttu ja täytetään 200 ml:n merkkiin milliQ vedellä.
- Valmis liuos autoklavoidaan ennen käyttöä.
- Autoklavoitu 0,5M EDTA-liuos säilyy huoneenlämmössä 6 kk.

10x TBE-puskurin (1000 ml) valmistusohje:

- Punnitaan 108 g Trizma base:a ja 55 g boorihappoa analyysivaa'alla ja liuotetaan dekantterissa magneettisekoittajalla milliQ veteen
- Lisätään 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0). Kaadetaan liuos mittapulloon ja täytetään 1000:ml:aan milliQ vedellä.
- Valmis liuos kaadetaan autoklavoinnin kestävään säilytyspulloon ja autoklaaviteippiin merkitään liuoksen nimi (10x TBE), valmistuspäivämäärä, vanhenemispäivämäärä, tekijän nimikirjaimet ja säilytyslämpötila.
- Valmis liuos autoklavoidaan.
- Valmistettaessa 1000 ml 1x TBE –liuosta sekoitetaan 100 ml 10x TBE ja 900 ml MilliQ vettä.
- 10x TBE:tä säilytetään huoneenlämmössä, jossa se säilyy yhden vuoden. 1x TBE säilyy käyttökelpoisena jääkaappilämpötilassa yhden kuukauden.

	1,2 % pieni geeli (60 ml)	1,2 % iso geeli (200 ml)	1,7 % pieni geeli (60 ml)	1,7 % iso geeli (200 ml)
Agarjauhe (g)	0,72	2,4	1,02	3,4
1 x TBE-puskuri (ml)	60	200	60	200
EtBr-liuos (µl)	6	20	6	20

- Punnitaan agarjauhe taulukon mukaan ja kaadetaan erlenmeyer-pulloon
- Lisätään 1 x TBE-puskuri taulukon mukaan
- Kiehautetaan 1 x TBE + agar mikroaaltouunissa välillä sekoittaen kunnes liuos on kirkas-
ta ja tasaista
- Jäähdytetään liuos varovasti sekoittaen, varotaan ilmakuplien muodostumista
- Liuos on jäähtynyt sopivasti, kun erlenmeyer-pullon pohjalla voi koskettaa hetken paljasta
ihoa siten, ettei se polta
- Lisätään jäähtyneeseen liuokseen EtBr-liuos taulukon mukaan